

TEKNILLINEN KORKEAKOULU

Kemian tekniikan osasto

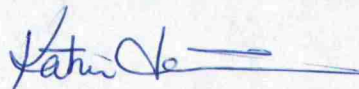
Karoliina Markkula

**ITIÖIVIEN SEKÄ BIOFILMIÄ MUODOSTAVIEN BAKTEERIE
HALLINTA KARTONKIKONEELLA**

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-
insinöörin tutkintoa varten.

Espoossa 02.12.2002

Valvoja:



Professori Katrina Nordström

Ohjaaja:

DI Jouni Saarinen

Tekijä Karoliina Markkula	Päiväys 02.12.2002
	Sivumäärä 98 (+14)
Työn nimi Itiöivien sekä biofilmiä muodostavien bakteerien hallinta kartonkikoneella	
Professuuri Soveltava mikrobiologia	Koodi Kem-30
Työn valvoja Professori Katrina Nordström	
Työn ohjaaja DI Jouni Saarinen	
<p>Diplomityön tavoitteena oli perehtyä kirjallisuudessa esitettyyn tietouteen paperikoneilla esiintyvien ongelmallisten mikrobien ominaisuuksiin sekä niiden seurantaan, tutkimukseen ja torjuntaan käytössä oleviin menetelmiin. Näitä tietoja hyväksikäyttäen pyrittiin selvittämään mitkä tekijät vaikuttavat tutkittavana olleen kartonkikoneen tuotehygieniaan ja ajettavuuteen, ja miten mikrobien aiheuttamia ongelmia voitaisiin vähentää.</p> <p>Elintarvikepakkausten valmistuksessa tuotehygienian kannalta itiöivät bakteerit ovat erityisen hankalia, koska bakteeri-itiöt selviävät helposti elinkelpoisina paperikoneen kuivatusosan läpi toisin kuin muut mikrobit. Työssä kartoitettiin kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksia eri prosessivirroissa ja pyrittiin etsimään korrelaatioita lopputuotteen mikrobiologisen laadun kanssa. Bakteerikantoja identifioimalla yritettiin hakea mahdollisia kontaminaatiolähteitä ja -reittejä, mutta tutkittujen kantojen määrä ei riittänyt laajempien päätelmien tekoon. Odotetusta poiketen lopputuotteesta eristettiin itiöivien bakteereiden lisäksi yksi itiöimätön bakteeri, <i>Sphingomonas capsulata</i>.</p> <p>Yksiselitteisiä syy-seuraus suhteita eri prosessivirtojen bakteeri- ja itiöpitoisuuksien ja lopputuotteen mikrobipitoisuuden välillä ei havaittu, mutta kiertoveden laadun nähtiin kuitenkin olevan erittäin keskeinen tekijä prosessin mikrobiologisen tilan kannalta. Lopputuotteen itiöpitoisuuden hallinnan kannalta vaikutti olevan tärkeintä pitää kokonaisbakteeripitoisuus jokapuolella prosessia kohtuullisen alhaalla ja huolehtia siitä, ettei lisäaineiden mukana pääse tulemaan poikkeuksellisia bakteerikontaminaatioita.</p> <p>Paperikoneen säiliöiden pinnoilla kasvavan liman vaikutusta prosessin mikrobiologiseen tilaa arvioitiin määrittämällä liman sisältämien bakteerien ja itiöiden määrää. Limojen havaittiin sisältävän niin paljon bakteereita ja erityisesti bakteeri-itiöitä, että tehokkaiden pesujen ja pesujen jälkeisten huuhteluiden merkitys mikrobintorjuntaohjelman toiminnalle on varmasti suuri.</p> <p>Paperikoneen ajettavuutta heikentävien limaa muodostavien bakteerien torjunnan tuotevalintaan kokeiltiin kahta eri menetelmää, laboratoriossa tehtävää viljelyyn perustuvaa tehoainetestiä ja prosessin sivuvirrassa pidettävien koepalojen analysointiin perustuvaa menetelmää, sekä pohdittiin näiden menetelmien käyttökelpoisuutta. Sellaisinaan molemmat menetelmät ovat hieman vaivallisia, mutta erityisesti yhdessä käytettynä niillä voidaan saada suhteellisen luotettavia tuloksia kohtuullisen nopeasti. Jotta koepalojen analysointiin perustuva menetelmä voitaisiin ottaa rutiininomaiseen käyttöön, se tulisi kuitenkin pystyä automatisoimaan ainakin osittain.</p>	

Author Karoliina Markkula	Date 02.12.2002 Pages 98 (+14)
Title of thesis Controlling spore-forming and biofilm forming bacteria on a board machine	
Chair Applied Microbiology	Chair Code Kem-30
Supervisor Professor Katrina Nordström	
Instructor Jouni Saarinen, M.Sc.	
<p>The purpose of this thesis was to gain knowledge on the problematic microorganisms present on paper machines; their properties, the methods developed for monitoring and studying them, and the methods used in controlling the microorganisms on papermaking processes. A process study was carried out on a board machine to find out which factors had an influence on the end product hygiene and the runnability of the board machine. Possibilities for reducing the problems caused by microorganisms were investigated.</p> <p>Spore-forming bacteria are troublesome on the production of food packaging board because, unlike other microorganisms, bacterial spores easily survive the drying section of a paper machine. In this thesis total bacterial counts and spore counts of several process flows were determined and an attempt was made to find a correlation between the bacterial count of process flows and the bacterial counts of the end product. Possible contamination sources and routes were investigated by identifying some of the bacterial strains present in the process. However, the number of the identified strains was insufficient to make any conclusions. Unexpectedly, in addition to the spore-forming bacilli, one non-spore-forming bacterium, <i>Sphingomonas capsulata</i>, was isolated from the end product.</p> <p>Direct correlation between the total bacterial and spore counts of process samples and the bacterial counts of the end product were not seen. However, white water seemed to have a very strong influence on the microbiology of the entire process. To control the bacterial count of the end product it seemed to be necessary to keep bacterial counts relatively low all over the process and to make sure that the additives are not contaminated.</p> <p>The importance of biofilm on the microbiological state of the process was examined by determining the amount of bacteria and spores on the slime deposits of different tanks. The calculated total amount of bacteria in the deposits was very high and emphasised the importance of proper boil outs as a part of an effective program for controlling microbes on a paper machine.</p> <p>Two different methods were used to evaluate the efficacy of products on controlling bacteria. One of the methods was based on cultivation of samples treated with biocides and the other was based on analysis of test coupons exposed to process water treated with biofilm inhibitor. Both methods have their weaknesses but especially when they are used together, they can give relatively accurate results in a reasonably short time.</p>	

ALKUSANAT

Tämän diplomityön kokeellinen osa on tehty 1.9.1998-1.4.1999 välisenä aikana eräällä suomalaisella kartonkikoneella yhteistyössä Hercules Finland Oy:n ja erään metsäteollisuuden konsernin kanssa.

Määritykset on tehty Karoliina Markkulan toimesta lukuunottamatta lopputuotteen mikrobiologisia määrittäyksiä, jotka tehtiin paperitehtaan laboratoriohenkilökunnan toimesta, sekä ensimmäinen syksyllä 1998 tehty kantojen eristys ja identifiointi tehtiin Herculeksen Belgian tutkimuskeskuksessa Franciska Van Outryven ja Kristine Van Peen sekä Gentin yliopiston henkilökunnan toimesta.

Karoliina Markkula valitsi työssä käytettävät menetelmät, suunnitteli koejärjestelyt ja tulkitsi saadut tulokset. Kartonkikoneella tehtyjen koeajojen suunnitteluun osallistuivat lisäksi Hercules Finland Oy:stä Jouni Saarinen, Pentti Ronkainen ja Tuovi Valtonen, sekä kyseisen kartonkikoneen käyttöinsinööri sekä tehtaan tutkimus- ja kehitysosaston henkilökuntaa.

Suuret kiitokset kaikille edellä mainituille henkilöille neuvoista ja avusta. Kiitos myös työni valvojalle professori Katrina Nordströmille kärsivällisyydestä ja neuvoista.

Haluan kiittää myös perhettäni tuesta, jota sain diplomityöni etenemisen hieman takkuillessa. Diplomityöstäni ei nyt tullutkaan loppumatonta ikuisuusprojektia, vaan yksi elinikäisen oppimisen toteutunut virstanpylväs. Erityiskiitokset Janille, joka sai minut vihdoinkin pakottautumaan tietokoneen äärelle viimeistelemään tämän työn valmiiksi.

Espoossa 02.12.2002



Karoliina Markkula

KIRJALLISUUSOSA

1	JOHDANTO	9
2	KARTONKIKONEEN TOIMINTA JA MIKROBIEN AIHEUTTAMAT ONGELMAT	10
2.1	KARTONKI- JA PAPERIKONEET MIKROBIEN KASVUYMPÄRISTÖNÄ	10
2.2	KARTONGIN VALMISTUS	11
2.2.1	<i>Pääraaka-aine – kuitumassa</i>	<i>11</i>
2.2.2	<i>Massan jauhatus ja kemikaalien lisäys</i>	<i>13</i>
2.2.3	<i>Perälaatikot ja viiraosa</i>	<i>14</i>
2.2.4	<i>Kuivatusosa</i>	<i>15</i>
2.3	VESIJÄRJESTELMÄT	16
2.3.1	<i>Tuorevesijärjestelmä</i>	<i>17</i>
2.3.2	<i>Kiertovesijärjestelmä</i>	<i>17</i>
2.3.2.1	<i>Vesikierron sulkemisen vaikutus prosessin mikrobiologiaan</i>	<i>18</i>
2.4	TUOTTEEN MIKROBIOLOGISET LAATUVAATIMUKSET	20
3	PAPERIKONEILLA ESIINTYVÄT MIKROBIT	20
3.1	ITIÖITÄ MUODOSTAVAT BAKTEERIT	22
3.1.1	<i>Bakteeri-itiöt</i>	<i>24</i>
3.1.2	<i>Itiönmuodostus</i>	<i>25</i>
3.2	BIOFILMIÄ MUODOSTAVAT BAKTEERIT	26
3.2.1	<i>Biofilmin esiintyminen ja sen vaikutukset prosessiin</i>	<i>26</i>
3.2.2	<i>Biofilmin muodostajat</i>	<i>28</i>
3.2.3	<i>Biofilmin muodostuminen</i>	<i>29</i>
3.2.3.1	<i>Pinnan likaantuminen</i>	<i>29</i>
3.2.3.2	<i>Mikrobien tarttuminen</i>	<i>30</i>
3.2.3.3	<i>Mikrobien kasvu ja biofilmin muodostumisen alku</i>	<i>30</i>
3.2.3.4	<i>Biofilmin kasvu</i>	<i>30</i>
3.2.3.5	<i>Biofilmin lohkeaminen tai irtoaminen</i>	<i>31</i>
3.2.4	<i>Biofilmin koostumus ja rakenne</i>	<i>31</i>
3.2.5	<i>Biofilmin muodostuksen aiheuttamien ongelmien ehkäisy</i>	<i>33</i>
3.2.5.1	<i>Prosessisuunnittelun vaikutus</i>	<i>33</i>
3.2.5.2	<i>Biofilmin vaikutus mikrobien antimikrobiaalisten aineiden sietoon</i>	<i>34</i>
3.2.5.3	<i>Bakteerien tarttumisen ja biofilmin tutkimus</i>	<i>35</i>

4	PROSESSIN MIKROBIOLOGISEN TILAN SEURANTA.....	35
4.1	SEURANTAMENETELMÄT.....	36
4.1.1	<i>Viljelyyn perustuvat menetelmät.....</i>	36
4.1.2	<i>Fysikaalisiin mittauksiin perustuvat pikamenetelmät.....</i>	37
4.1.3	<i>Mikroskopointiin perustuvia menetelmiä</i>	37
5	MIKROBIEN TORJUNTA	39
5.1	PERINTEISET BIOSIDIT	40
5.1.1	<i>Hapettavat biosidit</i>	40
5.1.2	<i>Pinta-aktiiviset biosidit.....</i>	41
5.1.3	<i>Solun pintaan tarttuvat biosidit</i>	41
5.1.4	<i>Entsyymejä inhiboivat biosidit.....</i>	42
5.1.5	<i>Solun jakautumista inhiboivat biosidit</i>	43
5.2	BIOFILMIN MUODOSTUKSEEN VAIKUTTAVAT LIMANTORJUNTA-AINEET	43
5.2.1	<i>Entsyymit</i>	44
5.2.2	<i>Dispergointiaineet</i>	44
5.2.3	<i>Biofilmi inhibiittorit.....</i>	45

TUTKIMUSOSA

6	MIKROBIMÄÄRITYKSET PROSESSI- JA LOPPUTUOTENÄYTTEISTÄ.47
6.1	MATERIAALIT JA MENETELMÄT
6.1.1	<i>Prosessinäytteiden kokonaisbakteeripitoisuuden määrittäminen</i>
6.1.2	<i>Prosessinäytteiden itiöpitoisuuden määrittäminen</i>
6.1.3	<i>Lopputuotteen mikrobipitoisuuden määrittäminen</i>
6.2	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU
6.2.1	<i>Massat</i>
6.2.2	<i>Kiertovesi, kiekkosuodin ja perälaatikot</i>
6.2.3	<i>Prosessiin sisään tulevat vedet</i>
6.2.4	<i>Tärkeimmät lisäaineet ja päällystyspastat</i>
7	PUHDASVILJELMIEN ERISTÄMINEN
7.1	MATERIAALIT JA MENETELMÄT
7.1.1	<i>Syyskuussa otettujen näytteiden analysointi.....</i>
7.1.2	<i>Joulukuussa otettujen näytteiden analysointi.....</i>

7.2	TULOKSET	76
7.3	TULOSTEN TARKASTELU	77
8	SÄILIÖIDEN SEINÄMILLE KASVANEIDEN LIMOJEN TUTKIMINEN	77
8.1	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	77
8.2	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	78
9	TEHOAINETESTIN TEKO LIMANÄYTTEELLE.....	80
9.1	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	80
9.2	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	81
10	BIOFILMIN MUODOSTUKSEN SEURAAMINEN ROBBINS-PUTKEN AVULLA.....	84
10.1	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	84
10.2	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	86
11	TULOSTEN YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	90
12	KIRJALLISUUSLUETTELO	94
	LIITTEET.....	99

LIITTEET:

LIITE A: Kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet prosessinäytteissä (30°C ja 50°C), sekä lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) ja prosessinäytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiokertoimet (6 sivua)

LIITE B: Kiertovesinäytteiden sekä massa- ja perälaatikkonäytteiden kokonaisbakteeripitoisuuksien ja itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiokertoimet (1 sivu)

LIITE C: Kiekkosuotimen kakun sekä massa- ja perälaatikkonäytteiden kokonaisbakteeripitoisuuksien ja itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiokertoimet (1 sivu)

LIITE D: Perälaatikoiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet ja lopputuotteen normalisoidut mikrobipitoisuudet osittain erillisiltä näytekierroksilta (2 sivua)

LIITE E: Keskeisimpien lisäaineiden sekä päällystyspастоjen ja taustan kostutus veden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuusmääritysten tulokset (1 sivu)

LIITE F: Identifiointia varten otettujen näytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet ja eristettyjen kantojen esiintyminen eri näytteissä (1 sivu)

LIITE G: Eristettyjen kantojen morfologiset ominaisuudet ja mahdollinen identifiointitulos (1 sivu)

LIITE H: Tehoainetestin tulokset (1 sivu)

KIRJALLISUUSOSA

1 Johdanto

Paperinvalmistusprosessit ovat viime vuosien aikana muuttuneet yhä haastavammiksi mikrobin torjunnan kannalta. Uusien paperikoneiden ratanopeudet ovat noin 2000 metriä minuutissa, mikä aiheuttaa sen että ratakatkot voivat aiheutua yhä pienemmistä vioista ja kuiturakenteen epätasaisuuksista. Samalla tavoin myös päällystyskoneiden ja painokoneiden nopeudet ovat nousseet. Jo pienet limakasaumat aiheuttavat ratakatkoja joko paperikoneella, päällystyskoneella tai viimeistään painokoneella.

Elintarviketeollisuus on alkanut asettaa entistä tiukempia vaatimuksia elintarvikepakauksissa käytettäville paperi- ja kartonkilaaduille. Hygieniavaatimukset ovat kiristyneet, koska tuotteiden säilytysajat ovat pidentyneet ja elintarvikepakkauksia käytetään yhä useammin myös ruuan lämmitys- ja ruokailuastiana. Lopputuotteen bakteeri- ja itiöpitoisuuksien hallintaan on siis panostettava yhä enemmän.

Samalla kun vaatimukset mikrobintorjunnan tehokkuudelle ovat tiukentuneet, on prosesseissa tapahtunut monia muutoksia, jotka ovat tuoneet uusia haasteita mikrobien hallintaan. Prosesseissa kierrätetään vettä yhä tehokkaammin, mikä aiheuttaa monia mikrobintorjuntaan vaikuttavia muutoksia. Kierrätysasteen kasvaessa kiertoveden lämpötila kohoaa, mikä useimmiten nopeuttaa mikrobien kasvua ja lyhentää monien mikrobintorjunta-aineiden puoliintumisaikaa. Lisäksi liuennetta ja kolloidaalisia aineita rikastuu kiertoveteen yhä enemmän eli mikrobeille on entistä enemmän ravintoa tarjolla. Lisäaineiden laimennuksiin käytetään tuoreveden sijaan sitä mikrobiologiselta laadultaan heikompaa puhdistettua kiertovettä.

Päällystyksen ja sitä kautta kalsiumkarbonaatin käytön yleistyessä yhä useammat prosessit toimivat neutraalilla pH-alueella eikä enää happamissa olosuhteissa. Huomattavasti useammat raaka-aineiden mukana tulevat bakteerit pystyvät lisääntymään neutraaleissa olosuhteissa, ja niiden kasvunopeus on yleensä suurempi kuin happamilla koneilla esiintyvillä hiivoilla ja homeilla.

Biologisten jäteveden puhdistamoiden käyttöönotto ja ympäristötietouden lisääntyminen on tuonut paineita käyttää paperinvalmistusprosesseissa mahdollisimman pieniä määriä mahdollisimman harmittomia mikrobintorjuntakemikaaleja.

Paperikoneilla esiintyviä mikrobeja tulisi siis pystyä torjumaan yhä tehokkaammin yhä haastavammissa olosuhteissa käyttäen entistä pienempiä määriä ja entistä vähemmän myrkyllisiä mikrobintorjunta-aineita. Tämän vuoksi onkin tarpeen löytää mahdollisimman tehokkaita seuranta- ja tutkimusmenetelmiä paperikoneilla esiintyville mikrobeille ja perehtyä prosesseihin niin hyvin, että pystytään paikantamaan ne kohteet, joihin mikrobintorjunnassa tulee keskittyä. Lisäksi on syytä perehtyä paperin valmistusprosessissa esiintyviin bakteerilajeihin riittävän hyvin, jotta voidaan erottaa toisistaan prosessin toiminnan kannalta täysin harmittomat ja haitalliset kannat, ja pystytään kohdentamaan seuranta ja mikrobintorjunta mahdollisimman tehokkaasti nimenomaan haitallisiin mikrobikantoihin.

Tämän diplomityön tarkoituksena olikin kartoittaa bakteerien esiintymistä eräällä kartonkikoneella ja kokeilla kahta eri menetelmää erityyppisten mikrobintorjunta-aineiden testaukseen. Paperikoneilla esiintyvistä mikrobeista työssä keskityttiin tarkastelemaan bakteereita, ja niistä erityisesti tuotehygienian kannalta merkittäviä itiöiviä bakteereita. Keräyskuitumassassa esiintyvien bakteerien käsittely rajattiin työn ulkopuolelle pääasiassa sen vuoksi, että keräyskuitumassoja ei käytetä elintarvikepakkauskartongin valmistuksessa.

2 Kartonkikoneen toiminta ja mikrobien aiheuttamat ongelmat

2.1 Kartonki- ja paperikoneet mikrobien kasvuympäristönä

Kartongin valmistusprosessi on erittäin laaja, eikä ole käytännössä mahdollista sulkea prosessia siten ettei prosessissa esiintyisi mikrobeja. Kartonkikoneille tulee jatkuvasti mikro-organismeja raaka-aineiden mukana ja mikrobeja on runsaasti kiinnittyneinä prosessissa erilaisille pinnoille. Mikrobeja tulee prosessiin jatkuvasti eri raaka-aineiden mukana, esimerkiksi käytettävän veden (kemiallisesti puhdistettu vesi ja raakavesi), kuitujen (erityisesti mekaaninen massa, hylkymassa ja kierrätyskuidut), päällystyspастоjen ja käytettävien kemikaalien mukana. Massa tulee integroiduissa paperitehtaissa

steriilinä massan valmistuksesta, mutta se saastuu jo hakuvettä lisättäessä ja massan sakeutta säädettyä (Jokinen, 1987).

Kontaminaatiolähteinä prosessissa toimivat paikat, joissa mikrobeilla on riittävästi aikaa lisääntyä tai itiöityä. Tällaisia ovat mm. kiertovesisäiliöt ja –tornit, joissa vesi seisoo pitkiä aikoja; hylkymassatornit, joihin kerätään katkojen aikana hylkymassoja, mikäli hylkyä ei riittävän nopeasti palauteta kiertoon; massatornit, joissa sekoitus ei ole riittävän tehokas, jolloin osa massasta jää seisomaan. Kuitujen talteenotossa lieteviipymä on usein riittävän pitkä mikrobien kasvun kannalta; koneen puristinosalta ja imuvesi-systeemistä tulevat vedet sisältävät runsaasti mikrobeja (Jokinen, 1987).

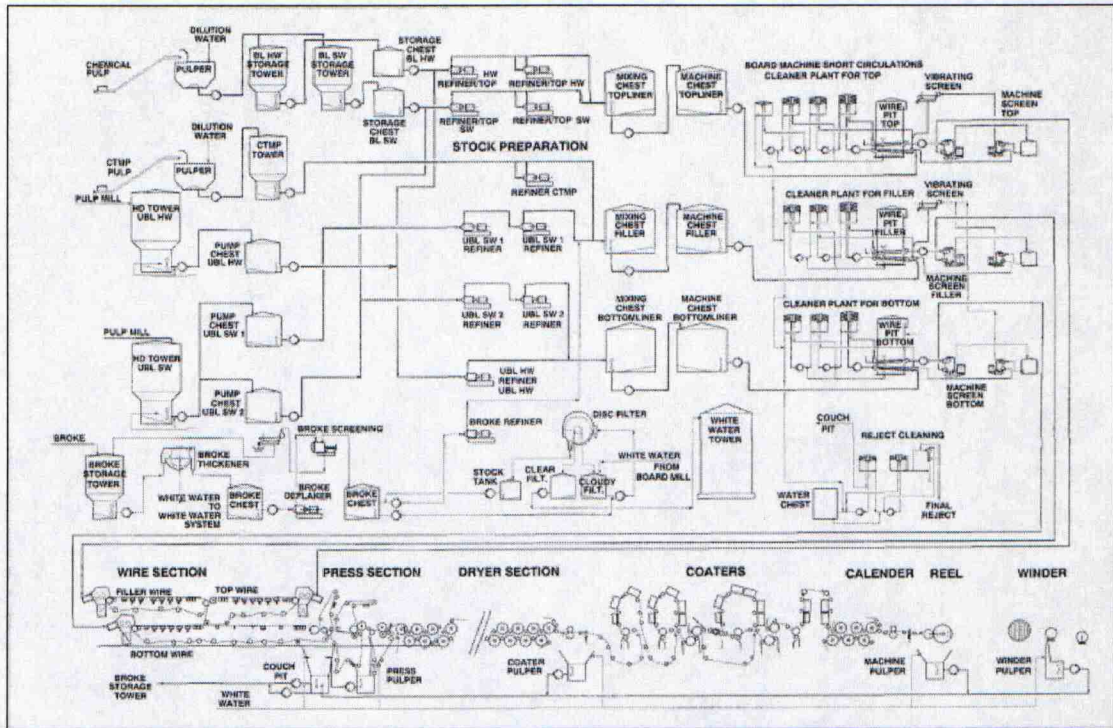
Paperikoneympäristö on suosiollista mikrobien kasvulle, lämpötilat ovat yleensä noin 30-50°C ja pH noin 4-10, lisäksi prosessiin virtaa sellun ja käytettävien kemikaalien mukana runsaasti ravinteita. Kun prosessiin vielä pääsee jatkuvasti mikrobeja raaka-aineiden mukana, on mikrobien läsnäolo ja kasvu paperikoneilla väistämätöntä (Väisänen *et al.*, 1998).

2.2 Kartongin valmistus

2.2.1 Pääraaka-aine – kuitumassa

Yksinkertaistetusti kartonkitehtaan tehtävä on tuottaa kuitumassasta lisäaineita apuna käyttäen kartonkia. Pääraaka-aine on siis sellumassa, jota tuotetaan sellutehtailla. Integroiduissa kartonkitehtaissa sellumassa tulee käytännössä steriilinä massan valmistuksesta, kauempaa tuotava sellu saattaa päästä kontaminoitumaan kuivatuksen tai kuljetuksen aikana (Jokinen, 1987). Kartonkikoneen keskeisimmät varastotornit, säiliöt ja prosessilaitteet on esitetty kuvassa 1.

Mekaaniset massat ovat käytännössä jauhattua puumassaa, eli ne sisältävät kaikki ravinteet ja hivenaineet, jotka olivat alunperin puussa. Kemiallisia massoja valmistettaessa käytettävät kemikaalit liuottavat suuren osan ravinteista ja hivenaineista jättäen jäljelle lähinnä selluloosaa ja hieman ligniiniä. Täten mekaaniset massat ovat mikrobeille kemiallisia massoja suosiollisempia kasvualustoja (Ross ja Hollis, 1976).



Kuva 1. Keskeisimmät säiliöt ja prosessilaitteet massaosastolla ja kartonkikoneen rakenne. Chemical pulp= sellu, CTMP Pulp= CTMP massa, Broke= Hylkymassa, White water= kiertovesi, Disk filter= Kiekkosuodatin, Storage tower= varastotorni, Refiner= jauhin, Mixing chest= Sekoitussäiliö, Machine chest= Konesäiliö, Cleaner plant= Pyörrepuhdistuslaitos, Wire pit= Viirakaivo, Wire section= Viiraosa, Press section= Puristinosa, Dryer Section= Kuivatusosa, Coaters= Päälystysosa, Calender= Kalanteri, Reel= Konerullain, Winder= Rullain, Pulper= pulpperi (Sundholm, 2000).

Hylkymassa sisältää usein myös liimauksessa käytettyä tärkkelystä sekä päälysteitä eli se on sellutehtailta tulevia massoja ravinnepitoisuudeltaan hankalampaa. Lisäksi hylkymassassa on jo valmiiksi olemassa koneen kuivatusosan läpi selvinneiden mikrobien itiöitä, joten hyllyn mikrobiologisen tilan seuranta ja hallinta on erittäin tärkeää.

Osa kartonkikoneilla esiintyvistä mikrobeista käyttää ravintonaan puukuituja, eli ne hajottavat selluloosaa ja hemiselluloosaa, joko lyhyemmiksi selluloosa-, hemiselluloosa- tai oligosakkaridiketjuiksi tai aina glukoosiksi asti. Tällöin kuitujen, ja siten myös lopputuotteen, lujuus heikkenee. Mikrobien metabolian vaikutuksesta puukuidut saattavat myös värjäytyä tai värilliset mikrobit saattavat tarttua puukuituihin kiinni, mikä heikentää massan kirkkautta ja siten lopputuotteen laatua (Ross ja Hollis, 1976).

2.2.2 Massan jauhatus ja kemikaalien lisäys

Ensimmäinen vaihe sellun prosessoinnissa on massan laimennus suurinpiirtein 3...4% sakeuteen, kuivana tulevat ostomassat sulputetaan eli hajotetaan pulpperissa. Sakeuden säädössä käytetään yleensä koneen kiertovettä, joten massa yleensä kontaminoituu viimeistään tässä vaiheessa. Seuraavaksi massa jauhetaan, eli kuituja rasietaan mekaanisesti (Anonyymi, 1993).

Jauhatuksessa kuitujen jäykkyys vähenee ja niiden fibrillaatioaste kasvaa, jolloin ne sitoutuvat paremmin. Jauhatuksesta massa ajetaan sekoitussäiliöön, missä massasulppuun lisätään erityyppisiä kemikaaleja. Kemikaalien laadut ja määrät riippuvat valmistettavasta tuotteesta. Taulukossa 1 on esitetty tyypilliset kemikaalit, joita käytetään pakkauskartonkia valmistavilla koneilla. Useisiin lisäaineisiin on lisätty jo valmistusvaiheessa mikrobisidejä tuotteen kontaminaatioriskin pienentämiseksi.

Taulukko 1. Tyypilliset aineet, joita käytetään valmistettaessa päällystettyä pakkauskartonkia (Kiviranta, 2000; Weise *et al.*, 2000).

Kuidut:	
	Valkaistu tai valkaisematon havupuumassa
	Valkaistu tai valkaisematon lehtipuumassa
	CTMP-massa
	Hylkymassa
Päällysteet ja päällysteissä	käytettävät lisäaineet:
	Kaoliini
	Sitova ainesosa (esim. tärkkelys)
	Titaanioksidi
	Vaahdonestoaine
	Dispergointiaine
	Mikrobisidi
Muut lisäaineet:	
	Täyteaineet
	AKD- tai hartsiliima
	Keitetty tärkkelys (massa/pintaliima)
	Värit
	Retentioaineet
	Vaahdonestoaineet
	pH:n säätö, usein NaOH
	Mikrobisidit

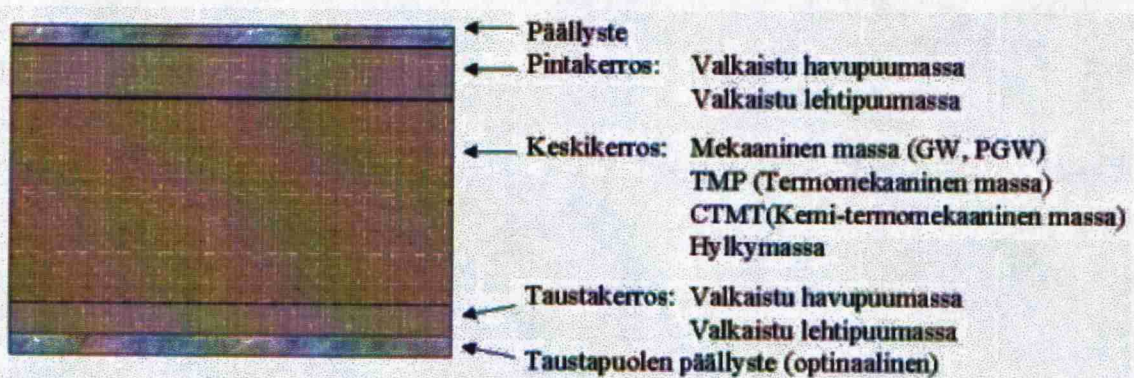
Käytettävistä lisäaineista liimauksessa ja retentioaineena käytettävä tärkkelys on erityisen herkästi pilaantuvaa, lähes kaikki mikrobit voivat käyttää sitä ravintonaan

(Jokinen, 1987). Kun mikrobit käyttävät tärkkelystä ravinnokseen, hydrolyytiset entsyymit hajottavat tärkkelystä liukeneviksi hiilihydraateiksi ja orgaanisiksi hapoiksi, mikä laskee pH:ta, tällöin tärkkiliuoksen viskositeetti laskee huomattavasti (Ross ja Hollis, 1976). Mikrobit saattavat käyttää ravinnokseen myös kemikaaleihin lisättyjä stabilointiaineita, tämä johtaa kemikaaliliuosten rakenteen muuttumiseen (Edwards, 1996). Mikrobin metabolian seurauksena myös väriaineet voivat muuttaa väriään (Edwards, 1996).

Täyteaineina ja päällystysaineina käytetään mm. talkkia, kaoliinia tai kalsiumkarbonaattia. Kaoliinia louhitaan maaperästä, joten se sisältää vaihtelevassa määrin maaperästä peräisin olevia mikrobeja. Myös karbonaatteja voidaan louhia, mutta kemiallisesti saostettu kalsiumkarbonaatti sisältää mikrobeja yleensä vain vähän (Mentu *et al.*, 1997).

2.2.3 Perälaatikot ja viiraosa

Konesäiliöstä massasulppu johdetaan monimutkaista putkistoa pitkin perälaatikkoon tai perälaatikoihin. Kartonki muodostetaan usein useammista kerroksista, joissa erityisesti massasuhteet ovat usein erilaiset. Mekaanista ja hylkymassaa käytetään lähinnä runkokerroksissa ja kemiallisia massoja lähinnä pinta- ja pohjakerroksissa. Tyypillinen taivekartongin rakenne on esitetty kuvassa 2. Viiraosalla kerrostus voidaan tehdä kerrostamalla jo perälaatikossa, useammalla perälaatikolla, jotka ovat samalla viiralla tai useammalla perälaatikolla, jolla on erillinen viira (Anonyymi, 1993).



Kuva 2. Tyypillinen Taivekartongin rakenne (Kiviranta, 2000).

Perälaatikossa massan sakeus yleensä noin 0,2...1,5% koneesta riippuen. Perälaatikosta sulppu ohjataan paineella nopeasti liikkuvalla viirakankaalle. Viiralla kuidut ja kemikaalit jäävät viiran päälle ja vesi suotautuu pois, jolloin paperiraina muodostuu. Suotautuva vesi ns. 0-vesi, joka sisältää kuituja sekä kemikaaleja otetaan talteen viirakaivoihin, mistä se johdetaan mm. massan laimennukseen. Mikäli perälaatikkoon johdetussa massasulpussa esiintyy hajoamattomia limakokkareita, jotka ovat irronneet esim. säiliön seinämiltä, ne voivat viirakankaalle päästyään tukkia viirakankaan. Tällöin limaläiskän kohdalla vesi ei pääse suotautumaan kankaan läpi ja ko. kohtaan ei myöskään kerry kuituja ja seurauksena on ohut kohta tai jopa reikä paperirainassa. Limakokkare voi jatkaa matkaansa rainan mukana tai se saattaa jäädä kiinni viiraan (Anonyymi, 1990a; Anonyymi, 1993; Harju-Jeanty ja Väättänen, 1984).

Paperiraina kuivuu edetessään viiralla, viiraosalla vedestä poistuu yleensä 96...98%. Viiralta osittain kuivunut raina, jonka kuiva-aine pitoisuus on yleensä noin 20...25%, siirtyy koneen puristinosalle. Puristinosalla rainaa puristetaan huopien ja puristintelojen välissä, eli vettä poistetaan paineen avulla. Puristinosalla limakokkareet estävät veden suotautumista ja aiheuttavat kartongin kosteusprofiilin epätasaisuutta. Kuiva-ainepitoisuus on puristinosan jälkeen noin 40...55%. Viirakankaat ja puristinhuovat puhdistetaan vesisuihkuilla rainan erkaannuttua niistä, jotta kaikki asiaankuulumaton aines saataisiin irti ennen seuraavaa kierrosta (Anonyymi, 1990a; Anonyymi, 1993; Väisänen *et al.*, 1998).

2.2.4 Kuivatusosa

Seuraavaksi raina siirtyy kuivatusosaan, missä vettä poistetaan haihduttamalla aina 87...94%:n kuiva-aine pitoisuuteen asti. Tämä tehdään pääsääntöisesti käyttämällä suurikokoisia höyrylämmitteisiä kuivatussylimintereitä. Kuivatuksessa rata lämmitetään ensin noin 85°C:een, jolloin veden haihtuminen alkaa. Lämpötila pysyy suunnilleen vakiona, kunnes kaikki kuitujen välissä oleva vapaa vesi on haihtunut. Jotta kuituihin sitoutunut vesi saataisiin poistettua, nostetaan kartonkiradan lämpötilaa kuivatusosan loppua kohti. Kuivatusosalla kartonkia voidaan myös mm. kiillottaa kiillotussylinterillä ja kartonki voidaan pintaliimata liimapuristimella. Pintaliimauksessa käytetään usein tärkkelyspitoista liuosta, jota mikrobit voivat hajottaa (Anonyymi, 1993).

Kuivunut raina voidaan vielä päällystää yhteen tai useampaan kertaan, joko toiselta tai molemmilta puoliltaan. Kartongin päällysteet koostuvat pigmentistä, kuten kaoliinista tai titaanioksidista, sekä sitovista aineista kuten, tärkkelyksestä, polyvinyylialkoholista, öljyistä, amiineista ja proteiineista. Päällystyspastan raaka-aineista erityisesti pigmentit sisältävät usein runsaasti mikrobeja. Jos mikrobit kuluttavat pastan sitovat ainesosat metaboliassaan, tuotteen ominaisuudet heikkenevät huomattavasti. Mikrobit saattavat käyttää pastoihin lisättyä stabilointiainetta tai vaahdonestoainetta ravinnokseen, jolloin pastan ominaisuudet muuttuvat. Pastoissa saattaa esiintyä myös anaerobitoimintaa, joka johtaa hajun muodostukseen (Edwards, 1996).

Päällystysosa voi olla integroituna kartonkikoneeseen tai se voi tapahtua erillisellä koneella. Päällysteen lisäyksen jälkeen päällyste ja kartonki kuivataan usein ensin infrapunakuivauksella ja sitten yksipuolisella ilmakeivauksella ja kuivaussyylintereillä, minkä jälkeen kartonki rullataan. Rulla leikataan vielä asiakkaan toivomaan kokoon tai standardikokoisiin arkkeihin.

Kartonkikoneen kuivanpään loppupuolessa kartongin pintalämpötila kohoaa 100°C:een ja sen ylikin, mutta viipymäaika on uusissa koneissa hyvin lyhyt, joten kaikki kartongissa olevat mikrobit eivät tuhoudu vaan ne jäävät tuotteeseen. Epäorgaanisen aineksen, kuten täyte- ja päällysteaineina käytettävien mineraalien, on havaittu suojaavan mikrobeja lämpökuolemalta, joten epäorgaanisten täyteaineiden ja pigmenttien hygieeninen laatu vaikuttaa merkittävästi lopputuotteen mikrobiologiseen laatuun (Anonyymi, 1990a; Lynch ja Hobbie, 1988).

2.3 Vesijärjestelmät

Kartonkitehtaan vesijärjestelmät jakautuvat kahteen pääosaan tuorevesi- ja kiertovesijärjestelmään. Tuorevedellä tarkoitetaan vesiasemalla puhdistettua raakavettä (joki- tai järvivesi), jota käytetään kartongin valmistusprosessissa. Kiertovedellä tarkoitetaan kuitupitoista vettä, joka on erottunut massalietteestä joko kartonkikoneen viiraosalla tai muussa valmistusprosessin vaiheessa.

2.3.1 Tuorevesijärjestelmä

Tuoreveden puhdistus sisältää yleensä seuraavat vaiheet: karkeasuodatus, hienosuodatus viirakudoksen läpi sekä hiekkasuodatus, jota useimmiten käytetään kemiallisen puhdistuksen yhteydessä. Tuorevettä käytetään seuraavissa käyttökohteissa:

- Prosessin täyttö ja lisävesi suoraan prosessiin
- Kemikaalien valmistus ja laimennus
- Kartonkikoneen suihkuvedet
- Pumppujen, sekoittimien yms. laitteiden akselien tiivistevedet
- Jäähdytysvedet
- Pesuvedet

Kiristyneistä jätevesipäästöjen lupaehdoista ja veden kulutuksesta aiheutuvista kustannuksista johtuen tuoreveden käyttöä on viime vuosina vähennetty huomattavasti. Tämä on tehty sulkemalla kiertovesi järjestelmää, eli puhdistetun kiertoveden käyttöä on lisätty huomattavasti kohteissa, joissa aiemmin on käytetty tuorevettä (Anonyymi, 1993; Weise *et al.*, 2000).

Tyypillisesti monikerroskartonkia tuottavat koneet kuluttavat nykyään noin 8-15 litraa vettä tuotettua kartonkikiloa kohti, kun vuonna 1971 veden kulutus oli noin 130 litraa vettä tuotettua kartonkikiloa kohti (Weise *et al.*, 2000).

Tuorevettä voidaan joutua käsittelemään mikrobintorjunta-aineilla, jos vedelle ei ennen tehtaalle tuloa ole ollut riittävää bakteereja tappavaa käsittelyä. Tätä reittiä prosessiin tulee uusia bakteerikantoja. Erityisesti hankalia rihmamaisia kasvustoja muodostava *Sphaerotilus natans* saapuu prosessiin usein tätä reittiä (Lindquist, 1998).

2.3.2 Kiertovesijärjestelmä

Kiertovesijärjestelmä jakautuu kahteen pääosaan, lyhyeen ja pitkään kiertoon. Lyhyellä kierrolla tarkoitetaan sitä osaa, joka muodostuu, kun viiraosalla suotautunut vesijae palautetaan massan laimentamiseksi välittömästi perälaatikkoa edeltävien puhdistuslaitteiden vaatimaan toimintasakeuteen ja/tai perälaatikon syöttösakeuteen. Pitkällä kierrolla tarkoitetaan viiraosalla suotautunutta vettä, jota ei käytetä lyhyessä kierrossa,

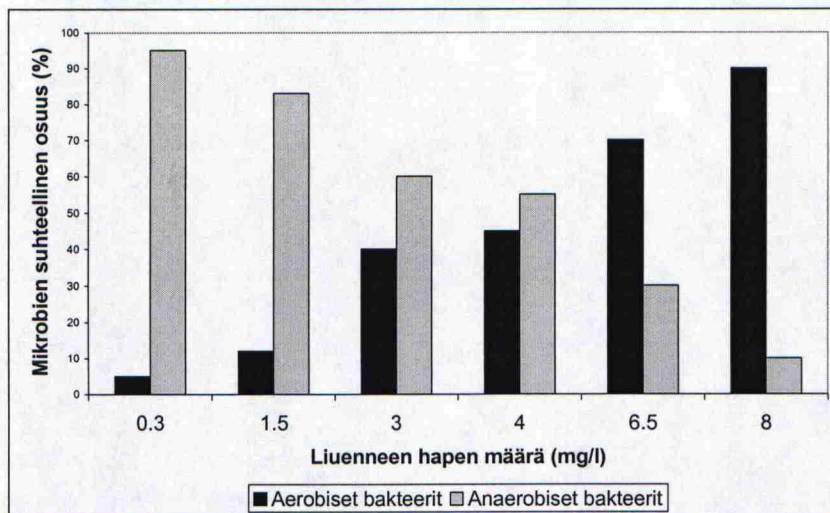
sekä massan käsittelyn muissa vaiheissa suotautuneiden vesijakeiden palautuksen muualla prosessissa käytettäväksi ja ylimääräisen kiertoveden poistamisen kuidun talteenoton jälkeen jäteveden puhdistukseen (Anonyymi, 1993).

Tehokas kiertoveden käyttö vesikiertoja suljettaessa vaatii kiertoveden riittävää puhdistusta, jotta tuorevesi voidaan korvata myös suurta puhtautta vaativissa kohteissa kuten suihkuvesissä. Kiertoveden puhdistuksen tarkoituksena on puhdistaa osa kiertovedestä uudelleen käyttöön sopivaksi ja parantaa jätevesilaitokselle johdettavan veden laatua sekä palauttaa kiertovedessä oleva kiintoainekeskiarvo takaisin prosessiin. Kiertoveden puhdistukseen käytetään yleensä joko mekaanista suodatusta (kiekkosuodin), laskeututusta tai vaahdotusta (Anonyymi, 1993).

2.3.2.1 Vesikierron sulkemisen vaikutus prosessin mikrobiologiaan

Vesikierron sulkeminen vähentää kiintoainehäviöitä, vähentää tuoreveden kulutusta, laskee jäteveden kiintoaine- ja vesimääriä sekä nostaa prosessin lämpötilaa ja lisää liuenneiden aineiden määrää prosessissa. Vettä kierrätettäessä myös liuenneen hapen määrä laskee noin 8 mg/l:sta 2-4 mg/l:aan tai vieläkin alemmaksi aerobisten mikrobien kuluttaessa sitä metaboliassaan. Liuenneen hapen määrän vaikutus aerobisten ja anaerobisten bakteerien suhteelliseen määrään on esitetty kuvassa 3. Aerobisten bakteerien kulutettua kaiken hapen myös anaerobisten bakteerien kasvua voi olla huomattavan paljon. Kiertovettä varastoitaessa suurissa kiertovesitorneissa viipymäajat ovat huomattavan pitkiä, jolloin mikrobeilla on hyvää aikaa lisääntyä ja itiöidä (Gudlauskis, 1996).

Vedessä oleva korkea kiintoainepitoisuus, liuenneiden aineiden runsas määrä ja kohonnut lämpötila parantavat mikrobien kasvuolosuhteita huomattavasti. Taulukossa 2 on esitetty epäorgaanisten ravinteiden pitoisuudet eräiden tehtaiden raaka ja kiertovesissä. Vesikiertojen sulkemisasteen kasvaessa ravinteiden määrät kohoavat entisestään (Jokinen, 1987).



Kuva 3. Liunneen hapen määrän vaikutus aerobisten ja anaerobisten bakteerien suhteelliseen määrään (Jung, 1978).

Mikrobien kasvu voi näkyä koneella liman muodostuksena, haihtuvien rasvahappojen muodostuksena tai haitallisten happojen muodostuksena. Em. hapot vaikuttavat orgaanisten ainesten sitoutumiseen, eli ne aiheuttavat käytettävien lisäaineiden sekä puukuitujen pilaantumista. Pahan hajuisten haihtuvien rasvahappojen esiintyminen lopputuotteessa on erityisen haitallista elintarvikepakkauskartongeissa (Gudlausi, 1996).

Taulukko 2. Epäorgaanisten ravinteiden pitoisuuksia eräiden tehtaiden vesissä. Yksikkönä mg/l.

	Tuorevesi, Kone A	Kiertovesi, Kone A	Kiertovesi, Kone B	Kiertovesi, Kone C	Kiertovesi, Kone D
N	0,6	17,7	4...13	0,7	0,6...0,8
P	0,04	0,2	1,6...5,3	0,2	0,4...0,5
Ca	3,5	27,0	28...300	EM	EM
Mg	1,5	7,6	7...12	EM	EM
K	1,4	14,0	2,7...3,5	EM	EM
Fe	0,5	0,3	2,7...3,5	0,1...0,2	0,3
Mn	EM	EM	2,0...2,4	<0,03	0,03...0,09
Cl⁻	EM	EM	EM	15...19	9...10

EM, ei määritetty. Viitteet: kone A (Jokinen, 1987), kone B (Väisänen *et al.*, 1998), koneet C ja D (Väisänen *et al.*, 1994).

2.4 Tuotteen mikrobiologiset laatuvaatimukset

Tuotteille on asetettu mikrobiologisia laatuvaatimuksia ainoastaan, jos ne tulevat kontaktiin elintarvikkeiden kanssa. Varsinaisia lakisäätteisiä sitovia standardeja ei kartongin mikrobipitoisuudelle ole Euroopassa kehitetty. Yleisimmin viitattu laatuvaatimus on ns. "Dairymen's Standard" jonka on asettanut U.S. Department of Health, Education, Welfare & Public Health Service, Food and Drug Administration. Standardin virallinen nimitys on "Fabrication of Single Service Containers and Closures for Milk and Milk Products- Guide for Sanitation Standards" (Anonyymi, 1991). Standardissa mikrobien määrän ylärajaksi asetetaan 250 pesäkettä muodostavaa bakteeria grammassa paperia tai kartonkia, määritysmenetelmänä käytetään TAPPI standardia T449 OM-90 (Anonyymi, 1990b). Tässä standardissa ja International Dairy Federationin teknisessä ohjeessa mainitaan lisäksi, että huuhtelu määityksessä yli 100 ml tilavuudeltaan olevissa pakkauksissa mikrobipitoisuus ei saa ylittää 50 pmy/pakkaus ja tilavuudeltaan alle 100 ml:n pakkauksissa mikrobipitoisuuden tulee olla alle 10 pmy/pakkaus. Tupottamalla tehtävissä määityksissä mikrobipitoisuus ei puolestaan saisi ylittää 1 pmy/cm². Lisäksi pakkaukset eivät saa sisältää lainkaan koliformisia bakteereita (Wainess, 1982). Saksalaisessa DIN-10082 standardissa voipaperille asetetaan raja-arvoiksi 6 hiiva- ja kaksi homepesäkettä muodostavaa yksikköä 10 cm² alalla (Anonyymi, 1989; Bendt, 1985; Pirttijärvi *et al.*, 1996).

Elintarvikepakkauskartongeista seurataan myös hajua ja makua. Anaerobisten mikrobien tuottamat haihtuvat rasvahapot ovat yksi tällaisia ongelmia aiheuttava aine-ryhmä. Nämä hapot ovat usein erittäin pahan hajuisia, ja ne saattavat aiheuttaa kartonkiin pakattaviin elintarvikkeisiin hajuvirheitä. Tietyt anaerobiset mikrobit tuottavat myös rikkivetyä, joka on erittäin pahan hajuisia, myrkyllistä ja lisäksi vielä erittäin räjähdysherkkää (Edwards, 1996).

3 Paperikoneilla esiintyvät mikrobit

Prosessiin tulee jatkuvasti syöttövirtojen mukana mikrobeja ja kasvuolosuhteet paperikoneilla ovat mikrobeille varsin suotuisat mikrobisidien lisäyksestä huolimatta. Edellä mainituista syistä paperikoneilla on jatkuvasti varsin runsaasti erilaisia mikrobeja. Vesikiertojen yhä enenevän sulkemisen seurauksena samat vedet kiertävät koneilla

yhä pitempään, jolloin ravinteet ja mikrobit pääsevät rikastumaan prosessiin. Osa mikrobeista kulkee vesifaasin mukana koneella, osa tarttuu kuituihin ja poistuu tuotteen mukana koneelta ja osa on tarttuneen esim. säiliöiden seinämiin. Pääosa paperikoneilla esiintyvistä mikrobeista on aerobisia bakteereja, hiivojen ja homeiden määrät ovat harvoin merkittäviä (Väisänen *et al.*, 1998).

Väisänen *et al.* (1998) tutkimuksissa hienopaperikoneilla määrässä päässä hallitsevia lajeja olivat *Bacillus coagulans*, *B. cereus* ja muut *Bacillus* lajit, *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *R. solanacearum*, *Pantoea agglomerans* sekä *Microbulbifer*-tyyppiset kannat, viira- ja puristinosalle kertyneissä punalimoissa esiintyi *Deinococcus*, *Aureobacterium* ja *Brevibacterium* lajeja. Suihkuvedestä eristettiin limaa muodostavia *Sphingomonas* lajeja. Paperin valmistuksessa käytettävissä hiilihydraattipohjaisissa kemikaaleissa, kuten tärkkelyksessä, esiintyviä mikrobeja olivat mm. *Bacillus licheniformis*, *B. circulans*, *Burkholderia cepacia* ja *Burkholderia caryophylli*. Mineraalipigmenteissä esiintyi *Aureobacterium esteroaromaticum*, *Bacillus licheniformis*, *B. sphaericus*, *Bordetella avium*, *Hydrogenophaga palleroni*, *Methylobacterium methylicum*, *Staphylococcus epidermidis* sekä *Microbulbifer*-tyyppisiä kantoja. Hiivoja ja homeita ei havaittu merkittäviä määriä.

Itiöivät bakteerit ovat erityisen ongelmallisia elintarvikepakkauskartonkeja valmistavilla koneilla, koska itiöt säilyvät elinkelpoisina kuivatusosan läpi mennessään, eli ne aiheuttavat tuotteen hygieniatason heikkenemistä. Yleisimpiä paperikoneilla esiintyviä itiöiviä bakteereja ovat *Bacillus* ja *Paenibacillus* lajit. Homeiden ja hiivojen itiöt eivät kestä kovinkaan korkeita lämpötiloja, joten ne eivät yleensä ole ongelmallisia lopputuotteen kannalta. Myseelinä kasvavat sienet saattavat kuitenkin aiheuttaa ongelmia prosessilaitteissa, esimerkiksi tukkimalla suuttimia tai suodattimia. Homeista paperikoneilla esiintyy *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus* ja *Trichoderma* sukujen lajeja (Klahre *et al.*, 1997).

Väisänen *et al.* (1998) tutkimuksissa hienopaperikoneiden lopputuotteista eristetyistä kannoista noin 80% kuului *Bacillus* tai *Brevibacillus* sukuihin. Nämä mikrobit olivat todennäköisesti selvinneet kuivatusosan kuumuudessa (paperin pintalämpötila 140°C) itiömuodossaan. Yleisimmin esiintyneitä basilleja olivat *B. coagulans*, *B. licheniformis*

ja *Brevibacillus brevis*, Gram-negatiiviset bakteerit olivat pääasiassa *Burkholderia cepacia* -bakteereita. Kiertovesien lämpötilan yleinen kohoaminen on vähentänyt hiivojen ja homeiden esiintymistä paperikoneilla.

3.1 Itiöitä muodostavat bakteerit

Itiöitä muodostavia aerobisia tai fakultatiivisesti anaerobisia bakteerisukuja ovat *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* ja *Thermoactinomyces*. Anaerobisia itiöitä muodostavia bakteerisukuja ovat *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospora*, *Sporohalobacter*, *Sporolactobacillus* (aerotolerantteja), *Sporomusa*, *Sporosarcina*, *Sulfobacillus* ja *Syntrophospora* (Stanier *et al.*, 1987; Holt *et al.*, 1994; Anonyymi, 1995). Paperikoneilla esiintyy edellä mainituista toistuvasti *Bacillus* spp., *Brevibacillus* spp. ja *Paenibacillus* spp. (Väisänen *et al.*, 1989; Väisänen ja Salkinoja-Salonen, 1989). Taulukossa 3 on esitetty paperikoneilla esiintyviä itiöiviä bakteereja ja niiden eristyspaikkoja.

Aiemmin kaikki sauvamuotoiset itiöitä muodostavat bakteerit luettiin *Bacillus*-sukuun, mutta nykyään *Bacillus*-lajeista on uudelleen nimetty osa uusiin *Paenibacillus*-, *Brevibacillus*- ja *Aneurinibacillus*-sukuihin. Monia *Bacillus polymyxa*-ryhmään luettuja mikrobeja uudelleen siirrettiin uuteen *Paenibacillus*-sukuun. *Paenibacillus*-sukuun siirrettiin mm. *B. alvei*, *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. pabuli* ja *B. validus* (Anonyymi, 1995, Shida *et al.*, 1997). *Brevibacillus*-sukuun kuuluu mm. *Brevibacillus brevis*, *Br. agri*, *Br. centrosporus* ja *Br. parabrevis* (Shida *et al.*, 1996; Nakamura, 1997). *Bacillus aneurinolyticus* -ryhmä nimettiin uudestaan puolestaan *Aneurinibacillus*-suvuksi (Shida *et al.*, 1996). *Bacillus*-suku on edelleen erittäin heterogeeninen sekä geneettisesti että fysiologisesti, joten jaottelu edelleen yhä useampiin entistä homogeenisempiin sukuihin on todennäköistä (Priest, 1993). *Sporosarcina*-sukuun luetaan kuuluvaksi itiöitä muodostavat kokit (Stanier *et al.*, 1987). Myseelinä kasvavat itiöitä muodostavat bakteerit luetaan *Thermoactinomyces*-sukuun (Stanier *et al.*, 1987).

Taulukko 3. Paperikoneilla esiintyviä itiöiviä bakteerilajeja ja niiden eristys paikkoja.

Suku & laji	Mistä eristetty	Viitteet
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Nestepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. azotoformans</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. cereus</i>	Viiran ympäristö	Väisänen <i>et al.</i> , 1998, Väisänen <i>et al.</i> , 1989
<i>B. cereus</i> -ryhmä	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. circulans</i>	Massatärkki, nestepakkauskartonki, paperi	Väisänen <i>et al.</i> , 1998, Väisänen <i>et al.</i> , 1989, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. coagulans</i>	Perälaatikko, konesäiliö, hierretty puumassa, mineraalipäällystetty ja päällystämätön paperi	Väisänen <i>et al.</i> , 1998
<i>B. firmus</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. flexus</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. licheniformis</i>	Bentoniitti, lima viiraosalla, elintarvikepakkauskartonki	Väisänen <i>et al.</i> , 1998, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. megaterium</i>	Lima viiraosalla, elintarvikepakkauskartonki	Väisänen <i>et al.</i> , 1989, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. mycoides</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. pumilus</i>	Voipaperi, pintaliima, elintarvikepakkauskartonki	Väisänen <i>et al.</i> , 1989, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. sphaericus</i>	Bentoniitti, elintarvikepakkauskartonki	Väisänen <i>et al.</i> , 1998, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. subtilis</i>	Pintaliima	Väisänen <i>et al.</i> , 1989, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>B. thuringiensis</i>	Lima viiraosalla	Väisänen <i>et al.</i> , 1989
<i>Brevibacillus brevis</i>	Lima viiraosalla	Väisänen <i>et al.</i> , 1989
<i>Paenibacillus macerans</i>	Bentoniitti, elintarvikepakkauskartonki	Väisänen <i>et al.</i> , 1998, Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>P. polymyxa</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>P. pabuli</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996
<i>P. validus</i>	Elintarvikepakkauskartonki	Pirttijärvi <i>et al.</i> , 1996

Kaikilla edellä mainituilla bakteereilla on Gram-positiivisille bakteereille tyypillinen soluseinän rakenne, joskin ne reagoivat Gram-värjäykseen vaihtelevasti. Erityisesti vanhemmat solut saattavat antaa negatiivisen värjäystuloksen. Monet tämän ryhmän bakteereista ovat liikkuvia. Nämä bakteerit ovat kemoautotrofeja, ne dissimiloivat orgaanisia substraatteja aerobista hengitystä, nitraattirespiraatiota tai fermentaatiota käyttäen (Stanier *et al.*, 1987).

3.1.1 Bakteeri-itiöt

Monilla Gram-positiivisilla bakteereilla on kyky muodostaa lepotilassa olevia erittäin hyvin olosuhdemuutoksia kestäviä itiöitä. Nämä bakteeri-itiöt eli endosporet tunnistaa mikroskopioitaessa niiden solunsisäisen muodostumispaikan ja korkean taitekertoimen perusteella sekä niiden ominaisuudesta jäädä värittömiksi värjättäessä soluja tavallisilla aniliiniväreillä (Stanier *et al.*, 1987).

Sienistä poiketen bakteereilla itiöiden muodostus ei ole solujen lisääntymistapa, vaan suojautumiskeino. Bakteeri-itiöitä ei muodostu normaalin kasvun ja solun jakautumisen yhteydessä. Itiöiden muodostus alkaa kun kasvuolosuhteet muuttuvat epäsuotuisemmiksi, esimerkiksi ravinteiden määrän vähentyessä (Neidhard *et al.*, 1990).

Normaalisti kustakin vegetatiivisolusta muodostuu yksi itiö. Kun itiö on valmis, se vapautuu vegetatiivisolun hajotessa. Vapaissa itiöissä ei esiinny havaittavaa metaboliaa, mutta ne säilyttävät kykynsä germinoitua ja kehittyä vegetatiiviseksi soluksi useiden vuosien, jopa vuosisatojen ajan. Tällaista solun täydellistä lepotilaa kutsutaan kryptobioosiksi. Bakteeri-itiöt kestävät hyvin kuumuutta, ultraviolettia ja ionisoivaa säteilyä sekä monia toksisia kemikaaleja (Stanier *et al.*, 1987).

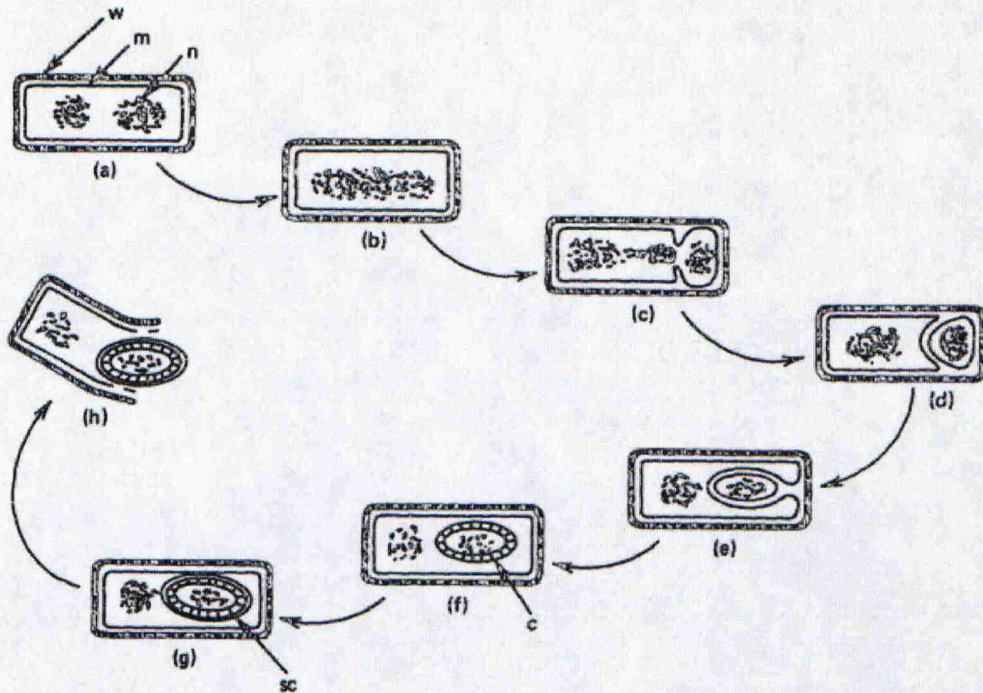
Bacillus- ja *Paenibacillus*-itiöiden on havaittu olevan erittäin hydrofobisia ja niiden on havaittu tarttuvan tiiviisti erilaisille pinnoille. *Bacillus cereus* -solujen on havaittu omaavan erityisen korkean adheesiokapasiteetin. Vaikuttaakin todennäköiselle, että tämä on yksi syy basillikontaminaatioiden ongelmallisuuteen. Itiöt tarttuvat pinnoille, eivätkä lähde normaaleissa pesuissa irti, ja olosuhteiden parannuttua ne germinoituvat ja kontaminoivat prosessin uudelleen (Husmark, 1993; Rönner *et al.*, 1990; Husmark ja Rönner, 1990).

3.1.2 Itiönmuodostus

Laboratorio-olosuhteissa itiönmuodostusta tutkittaessa itiöinti käynnistetään Freesen ja Heinzen (1983) mukaan yleensä jollakin seuraavista menetelmistä:

1. Käytettäessä runsas ravinteista kasvatusalustaa, itiöitä vapautuu runsaasti noin 6-8 tunnin kuluttua eksponentiaalisen kasvuvaiheen päättymisestä ja itiön muodostuksen alkamisesta. Itiöinnin käynnistää tällöin helposti metaboloituvan hiili-, typpi- tai fosfaattilähteen ehtyminen.
2. Itiöinti voidaan käynnistää korvaamalla runsas ravinteinen kasvualusta vähä ravinteisella alustalla, joka ei sisällä fosfaattia tai sisältää ainoastaan hankalasti metaboloitavaa hiili- tai typpilähdettä.
3. Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevassa kasvustossa itiöinti voidaan käynnistää lisäämällä alustaan esimerkiksi puriininukleotidien synteesiä inhiboivaa yhdistettä.

Bakteeri itiöiden muodostus on monimutkainen prosessi. Itiön muodostuksen päävaiheet on esitetty kuvassa 4. Vegetatiivisen *Bacillus subtilis* -solun täydellinen itiöityminen kestää laboratorio-olosuhteissa 37°C:ssa noin kuudesta kahdeksaan tuntia. Kun itiön muodostus on käynnistynyt alkaa kromosomaalisen materiaalin keskittyminen (kuvassa vaihe b), minkä jälkeen solun toiseen päähän alkaa muodostua jaoke eli septum, joka jakaa solun kahteen osaan, pienempään osaan tulee noin 20% solulimasta ja kopio emosolun kromosomaalisesta materiaalista (vaiheet c ja d). Emosolu nielaisee esi-itiön sisällensä (vaihe e) ja esi-itiö kasvaa ja sen pinnalle muodostuu paksu kerros, cortex eli itiön kaarna (vaihe f). Itiön pinnalle muodostuu edelleen itiön vaippa (spore coat), jonka alle jää mureiinikerros (vaihe g). *Bacillus cereus* -ryhmän bakteereilla itiön pinnalle muodostuu vielä itiökelmu (exosporium). Lopulta itiö saavuttaa lopullisen kokonsa ja muotonsa. Itiön vaipan kehittyttyä itiö kypsyy ja tyypilliset lämpö- ym. resistenssit kehittyvät. Kun itiö on valmis, emosolu hajoaa ja itiö vapautuu (vaihe h). Vapautuvat itiöt sisältävät erittäin vähän vettä, niissä ei esiinny havaittavaa metaboliaa ja ne kestävät erittäin hyvin kuumuutta ja säteilyä sekä erilaisia entsyymattisia ja kemiallisia käsittelyjä (Stanier *et al.*, 1987; Neidhardt *et al.*, 1990; Priest, 1993).



Kuva 4. Itiönmuodostuksen vaiheet: a)vegetatiivinen solu, b)kromosomaalinen materiaali keskittyy, c)jaoke (septum) alkaa muodostua, d)jaoke jakaa solun kahteen osaan, e)emäsolu nielaisee esi-itiön, f)itiön kaarna muodostuu, g)itiön vaippa muodostuu, h)kypsynyt itiö vapautuu emäsolun hajotessa (Young ja FitzJames, 1959).

3.2 Biofilmiä muodostavat bakteerit

3.2.1 Biofilmin esiintyminen ja sen vaikutukset prosessiin

Paperikoneiden pinnoilla esiintyy yleisesti limaa, jonka muodostumiseen mikrobit ottavat aktiivisesti osaa. Limakerrosten paksuus ja fysikaaliset ominaisuudet vaihtelevat runsaasti, mutta tyypillisesti limassa esiintyy runsas monimuotoinen mikrobifloora ja näiden mikrobien tuottamia eksopolysakkarideja, sekä puukuituja, kuitufibrillejä, täyteaine/päällystemineraali partikkeleita, pihkaa, lateksia ja muita paperin valmistuksessa käytettäviä lisäaineita (Robertson ja Taylor, 1994).

Biofilmin on määritelty olevan orgaaninen matriisi, jonka jollakin pinnalla kasvavat mikrobit ovat muodostaneet, ja joka koostuu pääasiassa mikrobisoluista, biopolymeereistä ja vedestä. Useimpien paperikoneilla esiintyvien mikrobien aiheuttamien limojen voidaan katsoa olevan tällaisia biofilmejä. Biofilmejä muodostuu kaikenlaisille veden peittämille pinnoille (Schenker *et al.*, 1998).

Limat aiheuttavat paperikoneilla ongelmia, kuten edellä on esitetty, irrotessaan pinnoilta ja päätyessään viiraosalle, lisäksi limakerrostumat kylvävät mikrobeja prosessivesiin (Costerton *et al.*, 1995). Lisäksi biofilmin muodostukseen liittyy orgaanisten ja epäorgaanisten saostumien kehittymistä ja raskasmetallien konsentroitumista (Schenker *et al.*, 1998). Biofilmit voivat tukkia putkistoja, pumppuja ja siivilöitä. Lisäksi ne aiheuttavat virtausvastuksen kasvua putkistoissa ja lisäävät pumppauksessa vaadittavia tehoja sekä aikaansaavat lämmönsiirtovastuksen kasvua lämmönsiirtimissä (Hagen ja Whitekettle, 1998).

Biofilmin paksuuden kasvaessa filmin pohjimmaisiiin osiin muodostuu vähähappinen ja lopulta hapeton kerros, jossa anaerobiset mikrobit pääsevät kasvamaan ja lisääntymään. Erityisesti sulfaatteja pelkistävät bakteerit aiheuttavat tällöin ongelmia aiheuttamalla teräspinnoilla korroosiota (Morton ja Surman, 1994). Sulfaatteja pelkistävät bakteerit aiheuttavat metallien liukenemista useilla eri mekanismeilla. Gaylarden (1989) mukaan tällaisia mekanismeja ovat:

- Katodinen depolarisaatio, jonka aiheuttaa näiden bakteerien hydrogenaasiaktiivisuus.
- Korroosiota aiheuttavien rautasulfidien muodostuminen raudan reagoidessa bakteerien metaboliassaan tuottaman rikkivedyn kanssa.
- Bakteerien tuottamien sulfidien indusoima korrosio.
- Bakteerien tuottaman vedyn indusoima halkeilu.
- Bakteerien tuottaman rikkivedyn pelkistyminen korrosiiviseksi rikiksi hapen päästessä tunkeutumaan biofilmin alaosiin esim. biofilmin lohkeamisen seurauksena.

Korroosiota aiheuttavat myös kloridi-ionien konsentroituminen biofilmiin sekä mikrobien aineenvaihduntatuotteena syntyvien orgaanisten happojen aikaansaamat pH-gradientit (Mentu, 1998). Uutela *et al.* (2002) ovat havainneet, että paperikoneella tapahtuva mikrobien aiheuttaman oksalaatin rikastuminen ja saman aikainen sulfaatin pelkistyminen puristin huovissa voivat johtaa korroosioon puristinsylinterin pinnalla.

3.2.2 Biofilmin muodostajat

Mikrobit hyötyvät huomattavasti biofilmissä kasvusta. Biofilmi suojaa mikrobeja monilta antibakteriaalisilta aineilta ja ympäristön äkillisiltä olosuhdemuutoksilta esim. kuivumiselta. Biofilmissä kasvavat bakteerit voivat kestää huomattavasti korkeampia mikrobisidipitoisuuksia, kuin nesteessä planktonisesti kasvavat samanlaiset mikrobit. Biofilmi tehostaa myös mikrobien ravinnon saantia. Biofilmi toimii ikäänkuin siivilänä, jonka läpi prosessivesi suotautuu, jolloin osa ravinteista adsorboituu limamatriisiin. Biofilmissä kasvavien mikrobien metaboliataso on usein varsin alhainen verrattuna nesteessä vapaasti kasvaviin mikrobeihin, tämänkin oletetaan vaikuttavan niiden korkeaan antibakteriaalisten yhdisteiden sietokykyyn (Wirtanen, 1995; Brown ja Gilbert, 1993).

Sopivissa olosuhteissa biofilmin muodostukseen voivat osallistua jotakuinkin kaikki mikrobit, mutta tietyt mikrobit muodostavat biofilmiä muita herkemmin. Kolari *et al.* (2001) havaitsivat laboratorio-olosuhteissa tehdyssä kokeissaan, että paperikoneilta eristetyt *Bacillus*-kannat eivät pystyneet yksinään kasvamaan metallipinnalla, mutta kun kasvatus systeemiin lisättiin primääristä tarttujaa, *Deinococcus geothermalis* -bakteeria, niin samaiset *Bacillus*-kannat alkoivat esiintyä runsaasti biofilmissä. Yleisimmin biofilmiä tuottavia mikrobeja kuuluu mm. *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* ja *Staphylococcus*-sukuihin (Wirtanen, 1995). Väisäsen *et al.* (1998) tutkimuksissa hienopaperikoneilla esiintyvistä mikrobeista erityisen herkästi ruostumattomasta teräksestä valmistetuille pinnoille tarttuivat *Burkholderia cepacia*, *Bacillus coagulans* ja *Deinococcus geothermalis*. Hienopaperikoneilla värillisten limojen on havaittu sisältävän erityisesti *Deinococcus*, *Acinetobacter* ja *Methylobacterium*-lajeja (vaaleanpunaiset limat), ja *Aureobacterium*, *Pantoea* ja *Ralstonia*-lajeja (kellertävät limat), sekä *Microbulbifer*-tyyppisiä kantoja (ruskeat limat) (Väisänen *et al.*, 1998). Punertavia paperikoneiden biofilmejä tutkiessaan Oppong *et al.* (2000) identifioivat limasta seuraavia lajeja: *Micrococcus agilis*, *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Serratia* sp., *Alcaligenes viscosus*, *Methylobacterium zatmanii*, *Roseomonas* sp., *Deionococcus grandis* ja *Flectobacillus* sp..

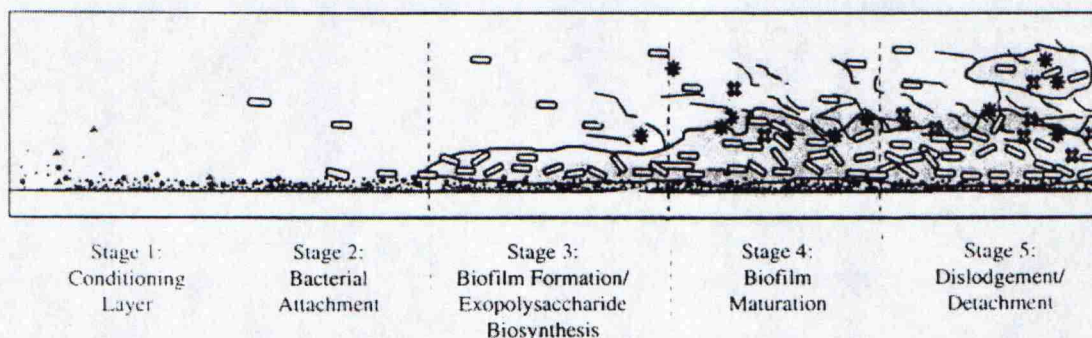
Väisäsen *et al.* (1994) tutkimuksissa paperi- ja kartonkikoneilta eristetyissä limoissa esiintyi toistuvasti mm. *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa, *P. cepacia*, *P. paucimobilis*, *P. caryophylli*, *Flavobacterium* sp., *Clavibacter michiganense*, *Bacillus licheniformis* ja *Bacillus cereus*.

3.2.3 Biofilmin muodostuminen

Monet orgaaniset ja epäorgaaniset ravinteet konsentroituvat liuoksesta kiinteälle pinnalle, jolloin pinnalle tarttumaan pystyvät mikrobit pääsevät paremmin käsiksi näihin ravinteisiin. Eksopolysakkarideista muodostuva limamatriisi toimii ikäänkuin ioninvaihtomatriisina, ravinteet tarttuvat tähän matriisiin, mistä ne kulkeutuvat tehokkaiden permeaasien toimesta soluihin. Lisäksi mikrobien erittämät ravinteita pilkkovat entsyymit konsentroituvat limamatriisiin, mikä tehostaa solujen metaboliaa. Limamatriisi suojaa soluja jonkin verran kuivumiselta ja antibakteriaalisilta aineilta (Morton ja Surman, 1995; Costerton *et al.*, 1981).

Biofilmin muodostumisessa voidaan katsoa olevan viisi eri vaihetta, jotka on kuvattu kuvassa 5 ja esitelty tarkemmin seuraavissa kappaleissa.



Kuva 5. Biofilmin muodostumisen eri vaiheet. 1. Orgaanisen aineksen kasautuminen, 2. Bakteerien tarttuminen, 3. Biofilmin muodostus/ eksopolysakkaridien tuotto, 4. Biofilmin kasvu, 5. Biofilmin lohkeaminen/irtoaminen (Schenker *et al.*, 1998).

3.2.3.1 Pinnan likaantuminen

Biofilmin muodostuminen alkaa kun veden peittämälle pinnalle tarttuu reversiibelisti ja irreversiibelisti vedessä esiintyviä orgaanisia ja epäorgaanisia aineksia, kiertovedessä tällaisia ovat mm. erilaiset polysakkaridit ja pihkapartikkelit. Tällaisen aineksen tarttuminen helpottaa ohi virtaavassa nesteessä olevien mikrobien tarttumista pinnalle (Bryers ja Weightman, 1995; Schenker *et al.*, 1998).

3.2.3.2 Mikrobien tarttuminen

Mikrobit tarttuvat pinnalle ensin reversiibelisti ja sitten mahdollisesti irreversiibelisti. Pinnan ja bakteerien ominaisuuksista riippuen bakteerit saattavat jatkaa matkaansa kohti parempia kasvuolosuhteita, tai ne saattavat jäädä kolonisoimaan pintaa. Tarttumisen alkuvaiheessa mikrobit ovat pinnassa kiinni vain heikosti attraktiivisilla voimilla ja solut voivat irrota pinnalta helposti pienehköjenkin veden virtauksen aiheuttamien leikkausvoimien seurauksena. Mikäli solut pysyvät pintaan kiinnittyneinä, ne alkavat tuottaa eksopolysakkarideja, jotka kiinnittävät solut tiukemmin kiinni pintaan. Kun solut ovat kiinnittyneet kunnolla pintaan, ne alkavat jakautua ja mikropesäkkeitä muodostuu (Bryers ja Weightman, 1995; Schenker *et al.*, 1998; Characlis, 1981).

3.2.3.3 Mikrobien kasvu ja biofilmin muodostumisen alku

Kun solut ovat tarttuneet pintaan tiiviisti kiinni ja alkaneet lisääntyä, alkaa varsinainen biofilmi muodostua. Mikropesäkkeiden muodostuessa solut tuottavat jatkuvasti eksopolysakkarideja, tällöin soluja ympäröivä limakerros paksunee. Tuloksena on paikallinen solujen kasvua suosiva suojainen kasvuympäristö. Kun biofilmi kasvaa edelleen solut ovat yhteydessä lähinnä biofilmmatriisiin eivätkä enää niinkään ympäröivään virtaavaan prosessiveteen (Bryers ja Weightman, 1995; Schenker *et al.*, 1998; Characlis, 1981).

3.2.3.4 Biofilmin kasvu

Mikrobit jatkavat jakautumistaan, eksopolysakkaridien tuottamista ja biofilmmatriisin laajentamista niin kauan olosuhteet ovat mikrobeille sopivat. Jatkuvan kasvun seurauksena biofilmistä muodostuu koko ajan paksumpi ja helpommin havaittava limakerros. Biofilmi kasvaa sekä pitkin pintaa että pinnasta ulospäin. Mitä enemmän biofilmissä on eksopolysakkarideja ja mitä paksumpi se on, sitä helpommin siihen tarttuu ohi ja läpi virtaavasta vedestä kuituja, erilaisia mineraali ja pihkapartikkeleita sekä muita virtaavia aineksia (Bryers ja Weightman, 1995; Schenker *et al.*, 1998; Characlis, 1981).

3.2.3.5 Biofilmin lohkeaminen tai irtoaminen

Biofilmin paksuuden saavutettua tietyn raja-arvon sen kasvunopeus on jotakuinkin tasapainossa pinnalta lohkeavan aineksen poistumisnopeuden kanssa. Tutkimuksissa on havaittu, että biofilmin pinnalta irtoaa tietyin väliajoin yksittäisiä soluja sekä biofilmikokkareita. Mitä paksumpi biofilmi on sitä suurempia irtoavat limakokkareet yleensä ovat. Tämä johtuu pääasiassa siitä, että paksut biofilmit joutuvat suurempien leikkausvoimien ja hydrodynaamisten voimien kohteeksi. Biofilmin irtautuminen voi johtua myös virtausolosuhteiden äkillisestä muutoksesta, esim. virtaavan nesteen virtausnopeuden tai sakeuden muutoksesta (Bryers ja Weightman, 1995; Schenker *et al.*, 1998; Characlis, 1981).

3.2.4 Biofilmin koostumus ja rakenne

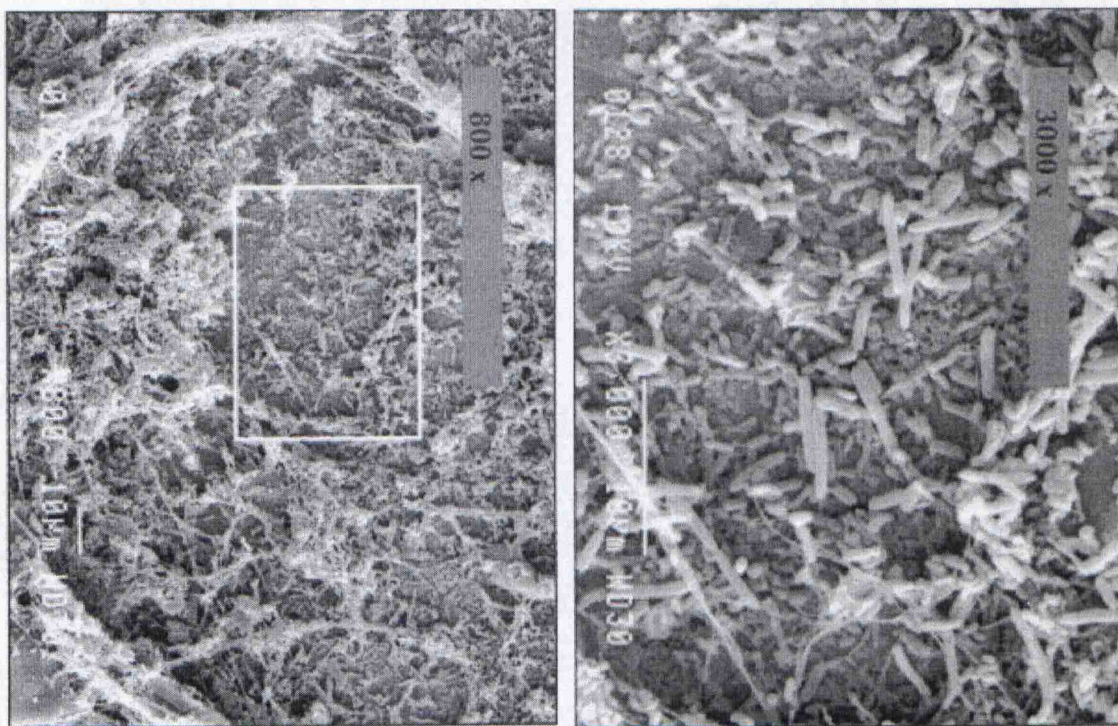
Väisänen *et al.* (1994) tutkimuksessa biofilmin havaittiin sisältävän yleensä noin 10^{11} ... 10^{12} bakteerisolua lima grammaa (kuivapaino) kohti. Tutkimuksessa solujen määrää arvioitiin käyttämällä hyväksi elektronimikroskopiaa, rasvahappoanalyysiä ja ATP-mittauksia.

Mikrobiaalisen biomassan määrää voidaan arvioida näytteen fosfolipidirasvahappoja analysoimalla. Paperi- ja kartonkikoneilla esiintyneissä limoissa esiintyi yhteensä 58 eri rasvahappoa ja näistä 19 rasvahappoa löytyi myös paperin valmistuksen raaka-aineista. Tämän perusteella voidaan mikrobien läsnäolon katsoa vaikuttavan erittäin paljon liman rasvahappokoostumukseen. Valitsemalla analysoitavaksi rasvahappoja, joita ei normaalisti esiinny raaka-aineissa, mutta joita esiintyy runsaasti mikrobien läsnäollessa, voidaan liman mikrobimäärää arvioida sen rasvahappokoostumuksen perusteella. Sopivia rasvahappoja on mainittu mm. Väisänen *et al.* (1994) ja Tunlid *et al.* (1992) tutkimuksissa.

Paperin ja kartongin raaka-aineista selluloosa- ja tärkkelysaketjun muodostuvat ainoastaan glukoosiyksiköistä. Biofilmin hiilihydraattikoostumusta määritettäessä Väisänen *et al.* (1994) löysivät limoista kuitenkin glukoosin lisäksi useita eri sokereita, joiden tiedetään olevan mikrobien tuottamien eksopolysakkaridien rakenneosia. Liman polysakkaridimatriisiin voidaankin siten katsoa olevan mikrobiologista alkuperää.

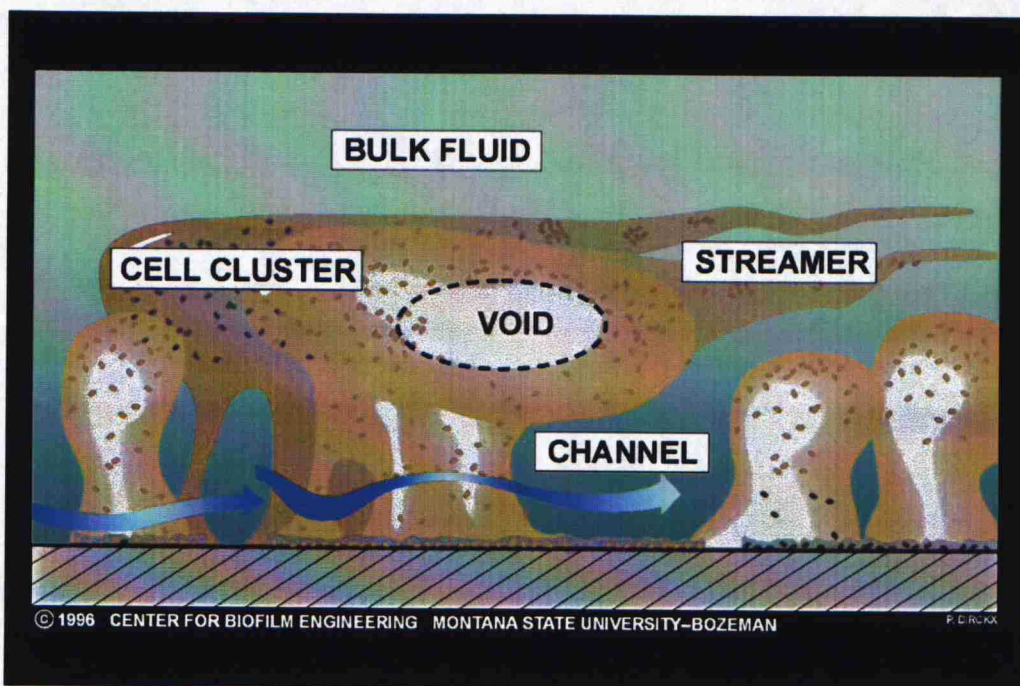
Bakteerien tuottamien polysakkaridien anionisten ryhmien on havaittu sitovan metalleja (Christensen, 1989). Marmon *et al.* (1991) ja Nurmiaho-Lassilan *et al.* (1990) tutkimuksissa paperi- ja kartonkikoneilla esiintyneihin limoihin havaittiin kertyneen 30...60 µg rautaa, 2...3 µg kromia ja 1 µg kuparia yhtä lima grammaa (märkäpaino) kohti, kuivaa lima grammaa kohti nämä luvut ovat 11...21 µmol rautaa, 0,8...1,2 µmol kromia ja 0,3 µmol kuparia. Väisäsen *et al.* (1994) tutkimuksissa liman uronihappojen sitomiskapasiteetin olevan 12,5...50 µmol divalenttisia kationeja kuivaa lima grammaa kohti. Raskasmetallien kertyminen limamatriisiin johtuneekin juuri uronihapporyhmiä sisältävien polysakkaridien esiintymisestä limassa.

Kuvassa 6 on Mattilan (2002) ottamia elektronimikroskopointikuvia paperikoneella koepalalle kasvaneesta biofilmistä. Kuvissa on havaittavissa mikrobisoluja sekä kuitufibrillejä.



Kuva 6. Elektronimikroskooppikuvia paperikoneella koepalan pinnalle muodostuneesta biofilmistä. SEM- mikroskopoinnissa näytteen on kiinnitettävä glutaraldehydillä ja kuivattava täysin kuivaksi ennen kuvien ottamista. Kuivatus voi aikaan saada mikrobien kutistumisen tilavuudeltaan alle puoleen kosteasta tilavuudestaan. Samoin mikrobien tuottama eksopolysakkaridimatriisi kuivuu pieneksi röpelöksi, kun se on kosteana hyvin vetistä ja hyytelömäistä limaa. Palkkien pituudet ovat 10 µm (Mattila, 2002).

Biofilmin rakenteen on havaittu olevan rakenteeltaan usein huokoinen. Luonnollisessa olotilassa eli märkänä, biofilmit ovat hyvinkin avoimia systeemejä, jotka sisältävät runsaasti eksopolysakkarideja ja veden täyttämiä kanavia mikrobien muodostamien mikropesäkkeiden välissä. Biofilmien rakennetta on kuvattu kuvassa 7. Mikropesäkkeiden väliin jäävien veden täyttämien alueiden ja kanavien ”tyhjäksi” jäämistä tai umpeen kasvamista säätelee substraattien, signaalimolekyylien ja metaboliittien esiintyminen (Davies *et al.*, 1998).



Kuva 7. Periaatekuva kypsän biofilmin rakenteesta. Kuva on piirretty biofilmien CLSM-mikroskoppoinnissa tehtyihin havaintoihin. Mikrobien muodostamia mikropesäkkeitä ympäröi virtaavan veden täyttämä kanavaverkosto (Anonymi, 1996).

3.2.5 Biofilmin muodostuksen aiheuttamien ongelmien ehkäisy

3.2.5.1 Prosessisuunnittelun vaikutus

Prosessissa esiintyvät pinnat ja pinnoilla vallitsevat virtausolosuhteet vaikuttavat äärettömän paljon biofilmin muodostukseen. Pintamateriaalin ominaisuudet, kuten sen sileys ja kunto sekä mahdolliset hiushalkeamat ja säröt, vaikuttavat olennaisesti biofilmin muodostumisen alkuvaiheessa. Mitä karheampi pinta on, sitä helpommin siihen tarttuu orgaanista ainesta ja mikrobisoluja. Biofilmin muodostusta voidaankin

ehkäistä käsittelemällä pintaa esimerkiksi mekaanisesti hiomalla (Mattila-Sandholm ja Virtanen, 1992).

Erilaiset yhteen ja erityisesti niissä käytettävät venttiilit on suunniteltava hygieenisen näkökohdat mielessä pitäen, tai niistä voi muodostua todellisia mikrobien muhima-paikkoja. Palloventtiilien rakenne aiheuttaa helposti ongelmia hygienian kanssa, mutta kalvo- ja istukkaventtiilit ovat yleensä hygieenisia. Erityisesti huonosti toteutetut näytteenotto venttiilit voivat aiheuttaa ongelmia kontaminoimalla prosessia ja antamalla väärää tietoa prosessin mikrobiologisesta tilasta. Laitteistojen sisällä olevat instrumentit ja laitteiden kuolleet kulmat, taskut, sekoittimien alapinnat, kytkimet ja putkiyhteet ovat usein otollisia biofilmin kerääntymispaikkoja. Em. tyyppiset systeemit tulisivat suunnitella siten, että virtauksen kannalta kuolleita kohtia olisi mahdollisimman vähän ja systeemi tulee pystyä tarvittaessa puhdistamaan (Mattila-Sandholm ja Virtanen, 1992).

3.2.5.2 Biofilmin vaikutus mikrobien antimikrobiaalisten aineiden sietoon

Pinnoille tarttuneiden biofilmin muodostaneiden mikrobien on yleisesti havaittu kestävän huomattavasti korkeampia mikrobisidipitoisuuksia, kuin vapaana nestefaasissa olevien mikrobien (Wirtanen, 1995). Mikrobisidien tehoa kannattaisikin testata menetelmillä, joissa mikrobisidien vaikutusta testataan biomatriisissa kasvaviin mikrobeihin eikä ainoastaan planktonisina esiintyviin mikrobeihin (Exner *et al.*, 1987).

Biofilmeissä esiintyy diffuusiota estävän limamatriisin ja soluryppäiden aikaan saamia erilaisia gradientteja. Matriisissa esiintyy mm. happi-, ravinne-, pH- ja sekundääri metaboliittigradietteja. Eri osissa matriisia solut kasvavat siis erilaisissa kasvuolosuhteissa, mikä vaikuttaa solujen fysiologiaan. Biofilmissä esiintyvien mikrobien onkin havaittu eroavan metabolisilta ominaisuuksiltaan planktonisina esiintyvistä genotyypiltään samanlaisista mikrobeista (Brown ja Gilbert, 1993; Le Magrex *et al.*, 1994).

Erityisesti kasvunopeuden ja yleisen metabolisen aktiivisuuden on havaittu olevan aerobisilla bakteereilla sitä alhaisempaa mitä syvemmillä limamatriisissa mikrobit sijaitsevat. Metabolian vähyyden arvellaan olevan yksi biofilmissä esiintyvien mikrobien mikrobisidien sietoa lisäävä tekijä (Brown ja Gilbert, 1993) Toinen

merkittävä tekijä on ilmeisesti limamatriisin toiminta suojaavan kerroksena, johon antimikrobiaaliset aineet eivät diffundoidu helposti

3.2.5.3 Bakteerien tarttumisen ja biofilmin tutkimus

Perinteisesti pinnalle tarttuneen mikrobimatriisin tutkimiseen on käytetty lähinnä biomassakonsentraation määrittämiseen (kuiva-aine tai kokonaisbakteeripitoisuus) ja epäsuoria biofilmin aktiivisuuden määrittämiin, kuten hapen kulutukseen tai ATP-pitoisuuteen. Viime aikoina huomiota on kiinnitetty entistä enemmän biofilmien heterogeenisyyteen, eli solujen esiintymiseen ryppäinä, erilaisten liuenneiden ravinteiden ja suolojen paikallisiin konsentroitumiin, sekä biofilmmatriisin fysikaalisten, kemiallisten, viskoelastisten ja massan siirto ominaisuuksien paikallisiin eroihin. Erityisen arvokasta tietoa biofilmien rakenteesta, toiminnasta ja vaikutuksesta mikrobien ominaisuuksiin on saatu erilaisilla uusilla biofilmin rakennetta vahingoittamattomilla menetelmillä. Biofilmin tuottamiseen on kehitetty monia erilaisia laitteistoratkaisuja (Bryers, 1994).

4 Prosessin mikrobiologisen tilan seuranta

Paperikoneiden mikrobiologisen tilan seuranta on erittäin tärkeää, jotta mikrobien aiheuttamat ongelmat havaitaan ajoissa ja tarpeen vaatiessa mikrobien torjuntaa voidaan tehostaa ongelmakohdissa. Mikäli mikrobiologinen kasvu pääsee liian korkealle tasolle, seurauksena on ongelmia prosessilaitteiden toiminnassa ja lopputuotteen laadun heikkenemistä. Jotta mikrobien torjuntaohjelmat voidaan optimoida, tulee prosessin tilasta saada riittävästi tietoa.

Tyypillisimmin paperikoneilla seurataan prosessin mikrobiologista tilaa tekemällä maljaviljelyt tai Easicult-viljelyt noin kerran viikossa kriittisiksi havaituista prosessivirroista. Nämä menetelmät ovat näytteenoton kannalta kaikkein yksinkertaisimpia. Näillä menetelmillä saadaan tulokset kuitenkin vasta muutaman vuorokauden kasvatuksen jälkeen ja saadut tulokset eivät kerro pinnoilla kasvavien mikrobien määriä. Merkittävimpiä ongelmia aiheuttavat mikrobipopulaatiot ovat kuitenkin juuri pinnoilla kasvavat mikrobikasvustot. Hyvään prosessin mikrobiologian seurantaan tulisikin kuulua myös pinnoilla kasvavien mikrobien seuranta vähintäänkin visuaalisesti.

4.1 Seurantamenetelmät

Mikrobien määritysmenetelmistä useimmat on kehitetty lähinnä nesteessä vapaina olevien mikrobien määrittämiseksi, mutta niitä voidaan soveltaa myös pinoilla kasvavien mikrobien määrittämiseksi, siten että mikrobit ensin irrotetaan pinnalta ultraäänisonikaatiolla, kaapimalla/raaputtamalla tms. menetelmällä

4.1.1 Viljelyyn perustuvat menetelmät

Edelleenkin yleisimmin käytetty menetelmä mikrobien määrän määrittämisessä on perinteinen maljaviljely. Viljelyssä käytetään yhtä tai useampaa lämpötilaa ja yleis- tai selektiivisiä ravintoalustoja. Usein prosessinäytteistä määritetään ainakin prosessilämpötilaa vastaavassa lämpötilassa kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet sekä mahdollisesti sienipitoisuus. Elintarvikepakkauskartonkia valmistavilla koneilla erityisesti pastanäytteet saatetaan viljellä myös *Bacillus cereus*-bakteereille spesifisillä maljoilla (Mentu, 1999).

TAPPI:n standardissa, T 631 om-89 Microbiological examination of process water and slush pulp, prosessiveden ja kuitusulpun mikrobiologisesta tutkimuksesta kasvatusalustana käytetään kokonaisbakteerimäärittämisessä standardin mukaista tryptoniagar, sienimäärittämisessä perunadekstroosiagar tai mykofiiliagar, siirrostusmenetelmänä käytetään maljavalumenetelmä. Kokonaisbakteerimaljoja kasvatetaan 36°C:ssa 48 tunnin ajan ja sienimaljoja 30°C:ssa viiden vuorokauden ajan. Lopputuotteen bakteeripitoisuus määritetään TAPPI standardin, T 449 om-90 Bacteriological examination of paper and paperboard, mukaan disintegroimalla lopputuotetta 1%:ksi sulpuksi ja siirrostamaan sitä maljavalumenetelmällä tryptonialustalle. Maljoja kasvatetaan 36°C:ssa 48 tuntia.

Perinteisen maljaviljelyn lisäksi käytössä on myös erilaisia viljelyyn perustuvia nopeutettuja menetelmiä, kuten Easicult (Oriola Diagnostica) ja Cult-Dip (Merck) hygieniallevyjä, Petrifilm-kasvatusalustoja (3M) sekä Millipore-kastolevyjä (Jalava ja Skurnik, 1994). Kehitteillä on SCAN-standardi, jossa paperiteollisuuden mikrobimäärittämiseksi käytetään Petrifilm-kasvatusalustoja (Mentu, 1999).

4.1.2 Fysikaalisiin mittauksiin perustuvat pikamenetelmät

Näytteiden mikrobipitoisuutta voidaan mitata myös määrittämällä näytteen sisältämän tai pinnalla olevan ATP:n määrä mittaamalla bioluminesenssi näytteestä, johon on lisätty lusiferaasi-lusiferiini-reagenssia. Markkinoilla on useita kaupallisia laitteistoja, mm. Bio-Orbitin ja Biotracen ATP-mittauslaitteet. ATP:n määrä näytteessä on verrannollinen erityisesti näytteessä olevien elävien solujen määrään, mutta hieman myös solujen kokoon (bakteeri/hiivasolu) ja niiden metabooliseen aktiivisuuteen (Jalava ja Skurnik, 1994).

Näytteiden mikrobipitoisuuden määrittämiseen on kehitetty laitteistoja, jotka määrittävät pienissä kennoissa olevaan ravintoalustaan siirrostetun näytteen aiheuttamaa sähköön johtokyvyn muutosta (esim. Bactometer / bioMerieux, Malthus / Malthus Instruments ja RABIT / DonWhitley Scientific) tai sameuden muutosta (Bioscreen / Labsystems, Cobas Bact Centrifugal Analyzer / Roche Diagnostica ja AutoMicrobic Systems, AMS / Vitek Systems) (Jalava ja Skurnik, 1994).

Käytössä on myös hapen kulutusta seuraavia ns. respiometrejä, jotka voidaan liittää suoraan prosessiin. Niissä seurataan aerobisten bakteerien aineenvaihdunnassaan käyttämän hapen kulutuksen nopeutta, jolloin saadaan selville bakteerien kokonaisaktiivisuus (Lindqvist, 1998).

Biosensor Ltd. on kehittänyt biofilmin muodostusta mittaavan on-line mittaussysteemin, BFM biofilm monitorin, joka mittaa prosessin sivuvirtaan liitettynä metalliliuskalle muodostuvan biofilmin paksuutta sekä virtaavan nesteen lämpötilaa, pH:ta, konduktiivisuutta, redox-arvoa, happipitoisuutta ja virtausnopeutta (Pietiläinen, 1998).

4.1.3 Mikroskopointiin perustuvia menetelmiä

Osa paperin valmistusprosessissa esiintyvistä mikrobeista on ravintovaatimuksiltaan hyvin hankalia, eivätkä ne kasva määrityksissä käytettävillä yleisalustoilla. Viljelytulokset eivät siten osoita näytteessä olevien bakteerien kokonaismäärää, vaan ainoastaan käytetyllä kasvatusalustalla käytetyssä kasvatuslämpötilassa lisääntymään pystyvien mikrobien määrän, mikä voi olla huomattavasti näytteessä olevien elävien mikrobien määrään alhaisempi. Mikrobien määrää onkin pyritty kvantifioimaan

käyttämällä erilaisia mikroskopointitekniikoita, joissa mikrobi solut värjätään ja solujen määrä lasketaan tietyltä näyte pinta-alalta tai tietystä tilavuudesta (Pieniniemi, 1995).

Epifluoresenssi mikroskopiassa preparaatti värjätään spesifisellä fluoresoivalla väriaineella. Mikroskopoitaessa näytteeseen lähetetään lyhyt aaltoista uv-alueen valoa, joka herättää pidempi aaltoista fluoresenssivaloa. Viritysvalo suodatetaan pois, jolloin vain fluoresoivat kohteet erottuvat tummasta taustasta. Yleisimmin käytetty väriaine on akridiinioranssi, joka värjää nukleiinihapot. Aktiiviset solut fluoresoivat tällä värjäysmenetelmällä oranssia ja inaktiiviset vihreää valoa. Myös monia muita spesifisiä fluoresoivia väriaineita on saatavilla. Muita DNA-värejä ovat mm. DAPI, EtBr ja SYTO. Myös GRAM-värjäys voidaan tehdä fluoresoivilla väriaineilla ja lektiini-väreillä voidaan värjätä biofilmien sokeripolymeerit (Kolari, 1998; Jalava ja Skurnik, 1994).

Epifluoresenssi mikroskopian etuna tavanomaiseen läpivalaisumikroskopiaan verrattuna on, että se perustuu pintavalaisuun. Tällöin näytteen ei tarvitse olla läpinäkyvä ja voidaan tutkia esim. metallipinnalle kasvanutta bakteerikasvustoa. Epifluoresenssi-mikroskopiaa käytetäänkin hyväksi erityisesti koepalojen mikroskopoinnissa (Kolari, 1998). Pieniniemi (1995) on lisäksi kehittänyt epifluoresenssiin perustuvan menetelmän kiertoveden sisältämien bakteerien lukumäärän selvittämiseksi.

Epifluoresenssimikroskopiaa käytetään paperiteollisuudessa hyväksi haluttaessa selvittää prosessissa muodostuneiden kasaumien aiheuttajia. Tällä menetelmällä nähdään nopeasti kuinka paljon kasauma sisältää mikrobeja, eli onko kasauma mahdollisesti mikrobialista alkuperää (Mentu, 1999; Wirtanen *et al.*, 1996).

Myös konfokaalilasermikroskopiassa (CLSM, confocal laser scanning microscopy) käytetään fluoresoivia väriaineita. Siinä valaisuun käytetään kuitenkin laseria, joka pyyhkii näytettä kerros kerrallaan. Nämä ”optiset leikkeet” yhdistetään tietokoneella ja tulokseksi saadaan kolmiulotteinen kuva mikroskopoitavasta kohteesta. Tätä menetelmää käytettäessä näyte voi olla elävä ja siinä ei ole näytteen rakenteeseen vaikuttavia työvaiheita, joten menetelmällä päästään näkemään esim. biofilmin todellista rakennetta myös pintaa syvemmmältä (Kolari, 1998).

Erityisesti biofilmin tutkimiseen on käytetty myös elektronimikroskopiaa, geeni-koettimia, kemiallisia koettimia ja magneettiresonanssikuvausta (MRI, magnetic resonance imaging) (Bryers, 1994). Mattila (2002) on tutkimuksissaan testannut ja kehittänyt erilaisia menetelmiä määrittää koepaloille paperikoneella tarttuneen mikrobiologisen aineksen määrää ja tutkia sen laatua. Käytettyjä menetelmiä olivat mm. ATP-mittaukset, *In-situ* hybridisaatio, elektronimikroskopia, EDS-alkuaineanalysointi, CLSM-mikroskopia, roiskealuesimulaattori, virtauskennosysteemi, fluoresoivien pallojen käyttö mikroskopoitaessa biofilmin morfologian tutkimiseen ja fluorometrinen kvantitatiivinen skannaus.

5 Mikrobien torjunta

Mikrobien aiheuttamien ongelmien minimoimiseksi paperinvalmistusprosessiin syötetään useissa eri kohdissa biosideja. Biosideilla pyritään estämään raaka-aineiden pilaantuminen ja prosessilaitteistojen limoittuminen. Biosideja syötetään koneille jaksollisesti kriittisiksi havaittuihin kohtiin. Koneille syötetään yleensä useita erilaisia biosideja useisiin eri kohteisiin. Tavallisimpia biosidien syöttökohteita ovat kiertovesisäiliöt, perälaatikot, pinta- ja massaliiman varasto- ja syöttösäiliöt sekä hylkysäiliöt (Salkinoja-Salonen, 1994).

Mikrobeille kehittyy ajan myötä resistenssiä käytettyjä biosideja kohtaan ja prosessiin valikoituu käytettyjä biosideja sietäviä kantoja, joten biosideja joudutaan aika ajoin vaihtamaan. Tyypillisesti biosideja annostellaan jaksottaisesti, tällöin biosidikonsentraatio kohoaa ajoittain riittävän korkealle, jotta konsentraatio olisi mikrobeille tappava, mutta kustannukset pysyvät kuitenkin riittävän alhaisina. Biosidien jatkuva annostelu kohtuullisen alhaisina pitoisuuksina aiheuttaa helposti erityisen hankalien resistenttien mikrobikantojen valikoitumiseen prosessin hallitseviksi kannoiksi (Valtonen, 1999).

Paperiteollisuudessa käytettäviltä biosideilta vaaditaan useita erityyppisiä ominaisuuksia hyvän mikrobisidisen tehokkuuden ja kustannustehokkuuden lisäksi. Biosidit eivät saa käyttökonsentraatioissaan häiritä paperin valmistusprosessia, eli tuotteiden on oltava yhteensopivia paperin valmistusprosessissa käytettävien lisäainekemikaalien kuten retentioaineiden kanssa. Paperiteollisuudessa käytettävät biosidit eivät saa olla voimakkaasti toksisia, eikä varsinkaan ekotoksisuus saa olla korkea. Lopputuote ei saa

sisältää merkittäviä määriä biosideja, erityisesti elintarvikepakkausmateriaalina käytettävissä tuotteissa ei saa esiintyä toksisuutta. Pintakäsittelykomponenttien kuten pastojen ja pintaliimojen säilöntään käytettävien biosidien on oltava käyttökonsentraatiossa hajuttomia, mauttomia ja fysiologisesti vaarattomia. Toisaalta osaan lopputuotteista kuten esimerkiksi paperipyyhkeisiin, pullojen etikettipaperiin ja saippuan pakkauspaperiin halutaan antimikrobiaalinen käsittely, jolloin biosidin tulee säilyä tuotteessa pitkiä aikoja (Paulus, 1993).

Biosidien käyttöä ohjaava säännöstö on Suomessa tällä hetkellä ensisijaisesti Suomen ympäristökeskuksen julkaisema lista sallituista suojauskemikaaleista, joka toteuttaa käytännössä kemikaalilain määräyksiä. Myös pohjoismainen ympäristömerkki – Joutsenmerkki – asettaa rajoituksia tiettyjen biosidien käytölle. Biosideja koskeva EU:n direktiivi on parhaillaan valmisteilla (Lindqvist, 1998; Mentu, 1997).

5.1 Perinteiset biosidit

Käytettävät biosidit sisältävät yleensä aktiiviaineita noin 1,5...50% (yhtä tai useampaa kemikaalia), mahdollisesti joitakin lisäaineita sekä liuotinta. Useissa biosideissa käytetään dispergointiainetta tai pinta-aktiivista kantaja-ainetta stabiloimassa aktiiviaineliuosta. Vesi on yleisesti käytetty liuotin, mutta myös orgaanisia liuottimia käytetään. Biosidit jaotellaan useimmiten niiden vaikutusmekanismin mukaan, esimerkiksi hapettaviin, pinta-aktiivisiin, solujen pinnalle tarttuviin, entsyymejä inhiboiviin ja jakautumista inhiboiviin biosideihin (Lindqvist, 1998; Mentu, 1997; Anonyymi, 1999).

5.1.1 Hapettavat biosidit

Hapettimien vaikutus perustuu niiden voimakkaaseen hapetuskykyyn, joka kohdentuu kaikkeen orgaaniseen materiaaliin, mukaan lukien mikrobit. Nämä yhdisteet tuhoavat niin Gram-negatiivisia kuin Gram-positiivisiakin bakteereita, sieniä ja leviä kuin myös itiöitäkin. Bakteereiden tuhoamisessa otsonin ja muiden hapettimien teho on varsin selkeää, mutta vaikutukset bakteri-itiöiden määriin ovat hieman monimutkaisempia (Korhonen ja Tuhkanen, 2001). Hapettavia mikrobisidejä käytetään usein myös torjuttaessa mikrobien aiheuttamia hajuongelmia (Davis ja Smith, 2001). Mikrobeilla esiintyy yleisesti katalaasi ja peroksidaasi aktiivisuutta, mutta riittävän korkeissa

aktiiviainepitoisuuksissa myös tällaiset mikrobit kuolevat. Hapettavat biosidit reagoivat mikrobin proteiinien ja mikrobeja pintaan kiinnittävien eksopolysakkaridien kanssa. Reaktioissa joko poistuu vety tai liittyy happi molekyylejä. Erityisesti rikkisiltarakenteet (S-S) reagoivat herkästi hapettimien kanssa. Tällaiset biosidit vaikuttavat mikrobipitoisuuden nopeasti usein alle viidessä minuutissa. Vaikutus ei ole kuitenkaan pysyvä (Paulus, 1993; Anonyymi 1999).

Hapettaviin biosideihin lasketaan kuuluvaksi mm. hypokloorihappo (HOCl), hypobromihappo (HOBr), hydantoiini (BCDMH), klooridioksidi (ClO₂), peretikkahappo (CH₃COOOH), vetyperoksidi (H₂O₂) ja otsooni (O₃) (Anonyymi, 1999).

Uusin tehoainetyyppi mikrobintorjunta-aineissa on in-situ paperitehtaalla tuotettava erittäin tehokas sekä nopea ja lyhyt vaikutteinen mikrobisidi, kuten Herculeksen markkinoima Spectrum RX3898, jonka kuvataan olevan aktiiviselta rakenteeltaan bromidi aktivoitu kloramiini (Werner ja Casini, 2002).

5.1.2 Pinta-aktiiviset biosidit

Pinta-aktiiviset biosidit reagoivat mikrobin solumembraanin proteiinien kanssa siten, että solumembraani hajoaa, mikä johtaa lopulta solun särkymiseen. Nämä biosidit helpottavat muiden biosidien tunkeutumista soluun ja lisäksi ne tunkeutuvat myös limakerrostumiin, minkä vuoksi niitä lisätään usein muita aktiiviaineita sisältäviin biosidituotteisiin. Pinta-aktiivisten aktiiviaineiden vaikutus alkaa näkyä noin puolesta tunnista tuntiin lisäyksen jälkeen. Pinta-aktiivisten aineiden reaktiot ovat yleensä reversiibeileitä, joten solun hajottua osa aktiiviaineista irtoaa membraanista ja voi reagoida uudelleen, mikä pidentää biosidin vaikutusaikaa (Paulus, 1993; Anonyymi 1999).

Pinta-aktiivisiin biosideihin lasketaan kuuluvaksi mm. Quat (N-alkyyliidimetyyli-bent-syyliammoniumkloridi) ja DGH (dodekyyliguanidihydrokloridi) (Anonyymi, 1999).

5.1.3 Solun pintaan tarttuvat biosidit

Solun pintaan tarttuvat biosidit reagoivat soluseinän komponenttien kanssa tarttuen solun pinnalla oleviin negatiivisesti varautuneisiin kohtiin, erityisesti fosfaatteja

sisältäviin rakenteisiin. Tämä häiritsee ulomman membraanin permeabiliteetin huomattavaan laskuun eli metaboliittien ja kuona-aineiden siirtyminen soluseinän läpi inhiboituu. Mikrobisidaalinen vaikutus alkaa metaboliatuotteiden sakkautumisella solun sisällä. Näiden aktiiviaineiden vaikutus alkaa näkyä noin puolen tunnin kuluttua lisäyksestä. Tämän tyyppiset aktiiviaineet aikaan saavat mikrobistaattisia vaikutuksia jo hyvin alhaisilla pitoisuuksilla, mutta mikrobisidiset vaikutukset vaativat varsin korkeita pitoisuuksia. Myös näiden aineiden reaktiot ovat usein reversiibeileitä, joten biosidin vaikutusaika on varsin pitkä. Kuitenkin esimerkiksi elektrofiilinen glutaraldehydi reagoi solun nukleofiilisten yhdisteiden, kuten proteiinien, aminohappojen ja nukleohappojen amino- tioli- ja amidi-ryhmien, kanssa irreversiibelisti (Paulus, 1993; Anonyymi 1999).

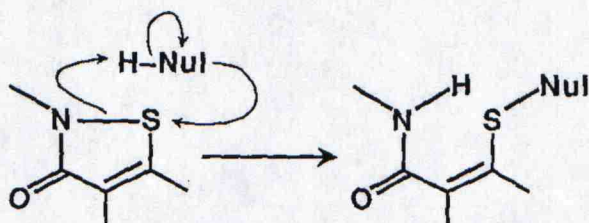
Tällaisia biosideja ovat mm. DBNPA (2,2-dibromo-3-nitrilopropionamidi), bronopol (BNPD, 2-bromo-2-nitropropaani-1,3-dioli), glutaraldehydi ja ditioli (5-okso-3,4-dikloro-1,2-ditioli) (Anonyymi, 1999).

5.1.4 Entsyymejä inhiboivat biosidit

Nämä biosidit inhiboivat solumembraanin sisäpuolella sijaitsevia soluhengitykseen liittyviä entsyymejä, mikä johtaa energian tuoton tai tiettyjen synteesien estymiseen. Esimerkiksi isotioatsolinonirenkaan sisältävät aktiiviaineet sisältävät aktivoidun N-S-sidoksen, joka reagoi kuvassa 8 esitetyllä reaktiomekanismilla mm. proteiineissa esiintyvien nukleofiilisten ryhmien kanssa. Tiedyt yhdisteet kuten eräät karbamaatit voivat sitoutua raskasmetalleihin, kuten Cu^{2+} -ioneihin ja kuljettaa ne mukanaan solun sisälle. Solun sisällä nämä raskasmetalli-ionit kilpailevat reseptoripaikoista magnesium, kalsium ja kalium-ionien kanssa syrjäyttäen nämä, inhiboida entsyymien toimintaa ja aiheuttaa proteiinien denaturoitumista. Metalleja kelatoivat yhdisteet sekoittavat solun metaboliaa myös sellaisenaan solun sisälle päästyään. Jotta nämä aineet toimisivat niiden on päästävä tunkeutumaan solun sisälle. Vaikutus näkyy yleensä aikaisintaan tunnin kuluttua lisäyksestä (Paulus, 1993; Anonyymi 1999).

Entsyymejä inhiboivia biosideja ovat mm. BNS (B-bromo-B-nitrostyreeni), MTB (metyleenibistiosyanaatti), sulfoni (Bis(triklorometyyli)sulfoni, BTS), karbamaatit, DGH (dodekyyliguanidiinihydrokloridi), ditioli (5-okso-3,4-dikloro-1,2-ditioli) ja

isotiatsoliinit (5-kloro-2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-oni/2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-oni) (Anonyymi, 1999).



H-Nul = nucleophilic entities of the microbial cell

Kuva 8. Isotiatsolinonirakenteen vaikutusmekanismi. H-Nul = mikrobisolun nukleofiilinen rakenneyksikkö (Paulus, 1993).

5.1.5 Solun jakautumista inhiboivat biosidit

Nämä biosidit inhiboivat solun jakautumiseen liittyviä entsyymejä. Mikäli tämä on aktiiviaineen ainoa vaikutusmekanismi, ainetta kutsutaan biostaattiseksi säilöntäaineeksi. Aineen vaikutus alkaa näkyä useiden tuntien kuluttua annostelusta.

Tällä tavoin vaikuttavia biosideja ovat mm. iso (5-kloro-2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-oni/2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-oni), 3,5 D (tetrahydro-3,5-dimetyyli-2-H-1,3,5-tiatsiini-2-tioni) ja sulfoni (Bis(triklorometyyli)sulfoni, BTS) (Anonyymi, 1999).

5.2 Biofilmin muodostukseen vaikuttavat limantorjunta-aineet

Perinteisten biosidien rinnalle on viime vuosina kehitetty erilaisia perinteisiä biosideja vähemmän haitallisia ja myrkyttömiä limantorjunta-aineita. Uusien limantorjunta-aineiden käyttöönottoon paperiteollisuudessa on vaikuttanut ennen kaikkea se, että ne ovat myrkyttömiä, turvallisia käsitellä ja ympäristön kannalta hyväksyttäviä. Uusia limantorjunta-aineita käytetään erityisesti silloin, kun biosidien käyttömääriä on pienennettävä, biosidien tehokkuutta on lisättävä ja koko limantorjuntaohjelmaa on parannettava (Schenken, 1996).

5.2.1 Entsyymit

Levaanihydrolaasikäsittely on jo vuonna 1973 patentoitu entsyymaattinen limantorjuntamenetelmä. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kyseinen entsyymi hajottaa levaania, joka on eräiden bakteerien tuottama eksopolysakkaridi. Menetelmä toimii ainoastaan silloin, kun ongelman aiheuttavat mikrobit tuottavat nimenomaan levaania, monet paperikoneilla esiintyvät ongelmalliset mikrobit tuottavat kuitenkin muun tyyppisiä polysakkarideja. Myös muita entsyymikäsittelyjä on patentoitu, mm. pentosanaasi-heksosanaasi vuonna 1976 (Lindvall, 1998).

Riittävän monipuolisella entsyymiseoksella biofilmin poisto on hyvinkin mahdollista, ainakin laboratorio-olosuhteissa (Johansen *et al.*, 1997). Entsyymit ovat kuitenkin niin spesifisiä ja ongelmallisten mikrobilajien määrä niin suuri että paperikoneen limantorjunta pelkästään entsyymivalmisteilla on käytännössä jotakuinkin mahdotonta (Bunnage *et al.*, 2000). Entsyymaattisia limantorjuntamenetelmiä kehitetään kuitenkin jatkuvasti ja erityisesti proteolyyttisten entsyymien käyttöä on tutkittu lisää viimeaikoina, joten on hyvinkin mahdollista, että tulevaisuudessa entsyymejä käytetään yhdessä muiden limantorjunta-aineiden kanssa (Siika-aho *et al.* 2000).

5.2.2 Dispergointiaineet

Anionisten biodispergointiaineiden vaikutusmekanismi perustuu siihen, että ne pystyvät pitämään pinnat puhtaina kemiallisista saostumista, lisäksi niillä on myös tiettyjä peseviä ominaisuuksia, jotka vaikeuttavat biofilmien muodostusta. Tällaisia dispergointiaineita ovat mm. lignosulfonaatit. Tietyillä koneilla lyhyen kierron limantorjunta pystytään hoitamaan kokonaan tällaisilla tuotteilla (Lindvall, 1998).

Non-ionisten dispergointiaineiden toimintatapa voidaan Schenkerin (1996) mukaan jakaa kolmeen vaiheeseen:

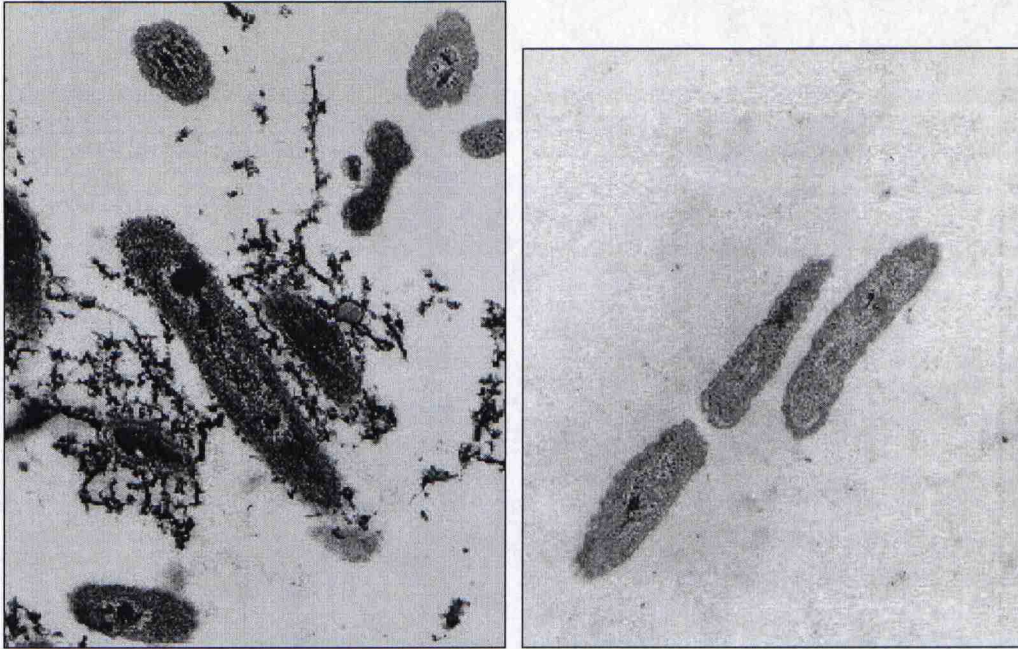
1. Uloin biofilmikerros poistuu ja loppu biofilmi muuttuu huokoisemmaksi.
2. Biofilmin sisäosissa sijaitseviin mikrobeihin päästään nyt helpommin käsiksi biosideilla.
3. Dispergointiaine irrottaa biofilmistä 2.-vaiheessa ”kuolleen” kerroksen ja hidastaa siten kerroksen kasvua.

Jatkuvasti annosteltuna non-ioniset dispergointiaineet estävät liman muodostusta vaikeuttamalla mikrobien tarttumista pinnoille (Schenker, 1996). Anioniset ja non-ioniset biodispergointiaineet vaikuttavat useimmiten ainoastaan löyhentämällä biofilmin rakennetta ja helpottamalla biosidien tunkeutumista biofilmiin. Näitä tuotteita käytetään ainoastaan yhdessä biosidien kanssa, koska niiden teho ei yksinään riitä pitämään pintoja puhtaina (Bunnage *et al.*, 2000).

Kationisten dispergointiaineiden perustuu mm. siihen, että polymeeriset kationiset molekyylit muodostavat likaa ja mikrobeja hylkivän kerroksen prosessissa esiintyville pinnoille. Ne pystyvät myös dispergoimaan limaa ja estämään agglomeraatiota. Lisäksi kationisten dispergointiaineiden on havaittu tietyissä olosuhteissa kiinnittävän typpi- ja fosforipitoisia ravinteita paperirainaan, jolloin mikrobien käytettävissä oleva ravinnemäärä pienenee kiertovedessä. Useimmiten kationisia dispergointiaineita käytetään limantorjunnassa yhdessä perinteisten biosidien kanssa (Lindvall, 1998).

5.2.3 Biofilmi inhibiittorit

Biofilmi-inhibiittoreilla tarkoitetaan aineita, jotka vaikuttavat biofilmin muodostukseen estämällä eksopolysakkaridikerroksen muodostumisen solujen pinnoille. Bakteerit, joilta eksopolysakkaridikerros puuttuu, eivät pysty tehokkaasti tarttumaan sileille pinnoille, ovat herkempiä biosidien vaikutuksille liman suojaavan vaikutuksen puuttuessa ja lisäksi eksopolysakkaridikerroksen puuttuessa bakteerit ja niiden mahdollisesti muodostama saostuma ei ole tahmea, eli se ei kerää ympärilleen nollakuitua ja muuta hienoaainesta (Bunnage *et al.*, 2000). Kuvassa 9 on esitetty biofilmi-inhibiittorin vaikutus limaamuodostaviin bakteerisoluihin. Toimintamekanismiltaan biofilmi-inhibiittorit ovat lähempänä entsyymejä kuin biodispergointiaineita, mutta ne eivät ole läheskään yhtä selektiivisiä kuin entsyymit (Gould, 2001).



Kuva 9. Biofilmi-inhibiittorin (Spectrum NT2001/sulfosukkinaatti) vaikutus limaa muodostaviin bakteereihin. Vasemmalla elektronimikroskopointikuva bakteerisoluista, joiden kasvatusalustassa ei ole ollut sulfosukkinaattia ja oikealla bakteerisoluja, joiden kasvatusalustassa on ollut sulfosukkinaattia. Eksopolysakkaridikerros näkyy kuivatussa näytteessä tummana röpelöisenä verkostona, märkänä eksopolysakkiridikerros turpoaa erittäin voimakkaasti.

Biofilmi-inhibiittoreiden käyttö on vielä varsin vähäistä, mutta käyttö saattaa lisääntyä kun paperiteollisuudessa pyritään siirtymään yhä myrkyttömämpiin mikrobien torjuntakeinoihin. Schenker *et al.* (1998) ja Mattila *et al.* (2002) havaitsivat prosessissa ajetuissa koeajoissa 80% ja 54% vähenemisen biomassan kertymisessä koepaloille.

TUTKIMUSOSA

6 Mikrobimääritykset prosessi- ja lopputuotenäytteistä

Prosessinäytteiden mikrobipitoisuuksien seurannan tarkoituksena oli selvittää kuinka suuren mikrobikuorman kukin tuleva virta toi mukanaan prosessiin. Näytteitä otettiin aluksi kaikista merkittävistä koneelle tulevista virroista, muutamien näytteenotto-kierrosten jälkeen puhtaimmat virrat jätettiin tutkimatta. Viljelyt tehtiin kokonaisbakteeri- ja itiömäärityksissä aluksi sekä 30 että 50°C:ssa, puolivälissä näytteidenottokierroksia prosessinäytteet alettiin viljellä ainoastaan 50°C:ssa, lukuun-ottamatta raakavettä ja kemiallisesti puhdistettua vettä, jotka viljeltiin ainoastaan 30°C:ssa. Näytteitä otettiin, kun tuotannossa oli elintarvikepakkauskartonkia. Näytteitä otettiin useaan eri otteeseen, jotta satunnaisen vaihtelun vaikutus tuloksia tarkasteltaessa pienenisi, ja jotta tulevien virtojen vaikutusta lopputuotteen mikrobipitoisuuteen voitiin paremmin arvioida.

Prosessinäytteiden mikrobimäärityksissä näytteiden ottotavalla on erittäin suuri merkitys. Jotta otettu näyte kuvaisi mahdollisimman hyvin säiliössä olevaa tai putkessa virtaavaa bulkkia, tulee nesteen, kuitusulpun tms. antaa virrata näytteenottohanan tms. läpi riittävän kauan ennen näytteenottoa. Tällöin näytteenottoputken seinämille ja/tai venttiiliin tarttunut lika ja mikrobit irtoavat ja kulkeutuvat nesteen tms. mukana pois näytteenottosysteemistä. Mikäli näyte otetaan liian pian venttiilin avaamisen jälkeen, voi näytteeseen joutua tällaisia ylimääräisiä mikrobeja. Erityisesti otettaessa näytteitä korkeapaineisissa putkistoissa olevista venttiileistä tulee venttiilin avaamisasteen olla joka näytteenottokerralla suurinpiirtein sama ja nesteen tulisi antaa valua yhtä pitkän ajan ennen näytteen ottoa.

6.1 Materiaalit ja menetelmät

6.1.1 Prosessinäytteiden kokonaisbakteeripitoisuuden määrittäminen

Kokonaisbakteeripitoisuus tarkoittaa niiden mikrobien pitoisuutta, jotka pystyvät lisääntymään kiinteällä yleisravintoalustalla kasvatettuina näkyviksi pesäkkeiksi sovitussa kasvatusajassa ja -lämpötilassa.

Kokonaisbakteerimääritystä varten homogenoitua näytettä ja/tai sen laimennossarjaa pipetoitiin 1 ml Aerobic Count Plate Petrifilmille (3M) ja levitettiin erityisellä levitystyövälineellä liuos tasaisesti filmille 20 cm² aluelle. Petrifilmejä inkuboitiin 3 vuorokauden ajan +30°C:ssa (mesofiilit) tai +50°C:ssa (termofiilit). Laimennusvetenä käytettiin steriiliä 0,9% NaCl-liuosta. Kokonaisbakteerimäärityksissä ei tehty rinnakkaiskokeita.

Aerobic Count Plate Petrifilmi ravintoalustat ovat valmiita yleisravinteet sisältäviä ravintoalustoja, jotka sisältävät ravinteiden lisäksi veteen liukenevaa hyytelöimisainetta ja tetratsolium-indikaattoria, joka helpottaa pesäkkeiden laskua värjäämällä muodostuvat pesäkkeet punaisiksi.

Kokonaisbakteeripitoisuus ilmaistiin viljelmille kehittyneiden punaiseksi värjäytyneiden pesäkkeiden summan ja viljelmiin käytettyjen näytetilavuuksien summan osamääränä. Yli 500 pesäkettä sisältävät viljelmät hylättiin tarkastelusta, sillä niissä saattaa esiintyä tiheän kasvun aiheuttamaa estovaikutusta. Lisäksi tietyt mikrobit käyttivät ravinnokseen petrifilmialustassa olevia hyytelöintiainetta, jolloin osa alustasta muuttui inkuboinnin aikana nestemäiseksi. Tällöin mikäli kasvu rajoittui vain osaan pinnasta, pesäkkeiden määrä laskettiin riittävän kiinteänä pysyneiltä alueilta. Myös runsaasti pesäkkeitä kasvaneilta maljoilta laskettiin pesäkkeiden määrä vain muutamien neliösenttien alueelta. (Petrifilmin pohjakalvoon on painettu laskemista helpottamaan ruudukko, jossa yhden ruudun pinta-ala on 1 cm².) Laskun jälkeen suoritettiin korjaus jakamalla laskettujen pesäkkeiden määrä laskettujen neliösenttien määrällä ja kertomalla tulos 20 cm²:lla, joka oli viljelmän kokonaispinta-ala.

Kokonaisbakteeripitoisuus laskettiin viljelmille kehittyneiden pesäkkeiden summan ja viljelmiin käytettyjen näytetilavuuksien summan osamääränä kaavaa (1) käyttäen.

$$C_{kb} = N_p / \Sigma(V_{l,i} * L_{n,i}) \quad (1)$$

Missä C_{kb} = kokonaisbakteeripitoisuus, pmy/ml

N_p = laskettujen pesäkkeiden lukumäärä

$V_{l,i}$ = petrifilmille pipetoidun laimennoksen tilavuus (ml) ja

$L_{n,i}$ = laimennoskerroin (ml näytettä/ml liuosta).

Tulokset ilmoitettiin yksikössä pmy/ml, missä lyhenne pmy tarkoittaa pesäkkeen muodostavaa yksikköä.

Koska volyymit, joista prosessinäytteitä otettiin, olivat niin valtavia – säiliöiden tilavuudet olivat noin 16...60 m² ja kiertovesitornin tilavuus vielä huomattavasti enemmän – näytteenotossa muodostuvan virheen katsottiin olevan niin huomattava, että kokonaisbakteerimäärityksissä ei katsottu tarpeelliseksi tehdä rinnakkaismäärityksiä.

6.1.2 Prosessinäytteiden itiöpitoisuuden määrittäminen

Itiömääritystä varten homogenoidusta ja pastöroidusta näytteestä ja sen laimennossarjasta valmistettiin pintalevitysmenetelmällä PCA-agarviljelmät, joita inkuboitiin 3 vuorokauden ajan +30°C:ssa (mesofiilit) tai +50°C:ssa (termofiilit).

Näytteiden ja laimennossarjan pastörinti suoritettiin pitämällä koeputkia 80°C:ssa vesihauteessa 10 minuutin ajan siten, että ajan laskeminen aloitettiin kun referenssi-putkessa olevan veden lämpötila oli kohonnut 80°C:een. Pintalevitysmenetelmässä näytettä ja sen laimennossarjaa pipetoitiin 0,2 ml kiinteälle PCA-maljalle, ja liuos levitettiin steriilillä levityskolmiolla maljan pinnalle. Näytteen imeytyttyä maljalle maljoja inkuboitiin lämpökaapissa ylösalaisin 3 vuorokauden ajan. Kustakin laimennoksesta tehtiin itiömäärityksissä kaksi rinnakkaista maljaa. Laimennusvetenä käytettiin steriiliä 0,9% NaCl-liuosta. Itiömäärityksissä ravintoalustana käytettiin Plate-Count-Agar (PCA) alustaa (MERCK, 1.05463), jonka koostumus oli seuraava:

peptoni (kaseiinista)	5,0 g/l
hiivauute	2,5 g/l
D(+)-glukoosi	1,0 g/l
agar	14,0 g/l

Ravintoalustan pH oli 7.0 +/- 0.2, ja se steriloidtiin autoklavoimalla +121°C:ssa 15 minuutin ajan.

Yli 300 pesäkettä sisältävät viljelmät hylättiin tarkastelusta, sillä niissä saattoi esiintyä tiheän kasvun aiheuttamaa estovaikutusta. Runsaasti pesäkkeitä kasvaneilta maljoilta laskettiin pesäkkeiden määrä vain osasta maljaa, esim. puolet tai 1/4 pesäkkeistä

jakamalla maljan pohja huopakynällä yhtäsuuriin sektoreihin ja laskemalla maljan vastakkaisilla puolilla olevilta sektoreilta pesäkkeet. Laskun jälkeen suoritettiin tarpeellinen korjaus.

Erittäin liikkuvat bakteerit (mm. eräät *Bacillus*, *Pseudomonas*- ja *Proteus*-lajit) saattavat levitä kasvatuksen aikana pitkin maljan pintaa. Mikäli leviävän pesäkkeen kasvu rajoittui vain osaan pinnasta, muiden lajien lukumäärä pyrittiin arvioimaan "puhtaalta" alueelta.

Itiöpitoisuus ilmaistiin viljelmille kehittyneiden pesäkkeiden summan ja viljelmiin käytettyjen näytetilavuuksien summan osamääränä kaavan (2) mukaisesti.

$$C_i = N_p / \Sigma(V_{l,i} * L_{n,i}) \quad (2)$$

Missä C_i = itiöpitoisuus, pmy/ml

N_p = laskettujen pesäkkeiden lukumäärä (pmy)ja

$V_{l,i}$ = maljalle pipetoidun laimennoksen tilavuus (ml) ja

$L_{n,i}$ = laimennoskerroin (ml näytettä/ml liuosta).

6.1.3 Lopputuotteen mikrobipitoisuuden määrittäminen

Lopputuoteesta leikeltiin aseptisesti 3 g pieniä kartongin palasia hajotuskannuun, lisättiin 297 g steriiliä fosfaattipuskuriliuosta (pH 7) ja homogenoitiin Waring 32 BL 80 homogenisaattorilla (Waring Products Division, USA, 1990) 3 minuutin ajan. Fosfaattipuskuriliuos steriloidtiin autoklavoimalla se 121°C:ssa 20 minuutin ajan, ja sen koostumus oli seuraava:

KH_2PO_4	34 g
K_2HPO_4	44 g
Kalvosuodatettu vesi	500ml

Kokonaisbakteerimäärittystä varten kuitusulppua pipetoitiin 10 ml yhteensä kolmelle petrimaljalle, eli kullekin maljalle pipetoitiin noin 3,3 ml sulppua. Mikäli oli oletettavaa, että näytteen kokonaisbakteeripitoisuus oli huomattavan korkea, kuitusulpusta tehtiin vielä 10^{-1} ja 10^{-2} laimennokset, joita pipetoitiin 1 ml maljalle. Kun näytteet oli pipetoitu

maljoille kaadettiin noin 18 ml 45°C:ksi temperoitua MERCKin Tryptoni-hiivauute-glukoosi (THG) alustaa, jonka koostumus oli seuraava:

Tryptoni	5,0 g/l
Hiivauute	2,5 g/l
Glukoosi	1,0 g/l
Agar	15,0 g/l

THG-alustan pH oli 7,0 ja se steriloitiin autoklavoimalla 20 minuutin ajan 121°C:ssa. Maljoja sekoitettiin pyörittelemällä kunnes sulppu oli sekoittunut tasaisesti agaralustaan, minkä jälkeen maljojen annettiin jähmettyä. Jähmettyneitä maljoja inkuboitiin 30°C:ssa kolmen vuorokauden ajan.

Lopputuotteen mikrobipitoisuus määitykset tehtiin kartonkitehtaan mikrobiologisessa laboratoriossa tehtaan toimesta, joten näytteenoton ajankohdat eivät ole aivan samoja kuin prosessinäytteiden otossa. Lisäksi tulosten luottamuksellisuuden vuoksi tuotteen mikrobipitoisuudet on esitetty tässä työssä siten, että syyskuun alusta joulukuun loppuun asti saaduista tuloksista on otettu logaritmiarvo ja saadut arvot on sitten normalisoitu. Kyseisen ajanjakson korkein mikrobipitoisuus saa tällöin arvon yksi ja pienin pitoisuus arvon nolla.

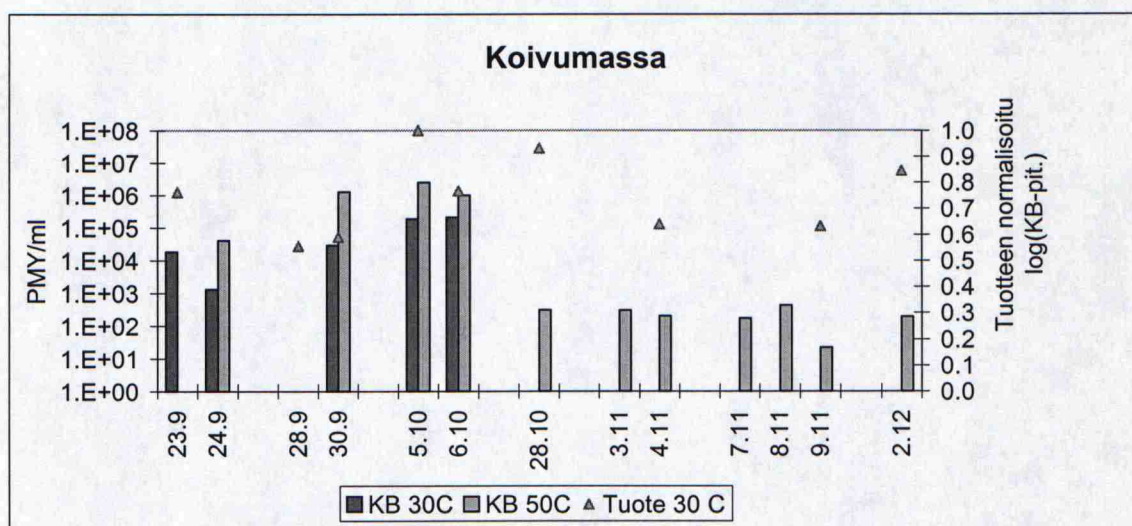
6.2 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kappaleissa 7.2.1-7.2.3 käsitellään keskeisimpiä tuloksia saaduista kokonaisbakteeri- ja itiömäärittelyistä. Prosessinäytteiden mikrobimäärittelysten tulokset on taulukoitu kokonaisuudessaan liitteessä A. Samaisessa taulukossa on esitetty myös eri määrittelysten tulosten ja lopputuotteen mesofiilisten (30°C) itiöiden pitoisuuden väliset korrelaatiokertoimet. Muutamat korrelaatiokertoimet, joihin ei tässä tulosten tarkastelussa viitata, olivat kohtalaisen suuria. Niiden kohdalla näytteenottokertojen määrä on ollut niin alhainen, että korkean laskennallisen korrelaation on oletettu olevan sattumaa.

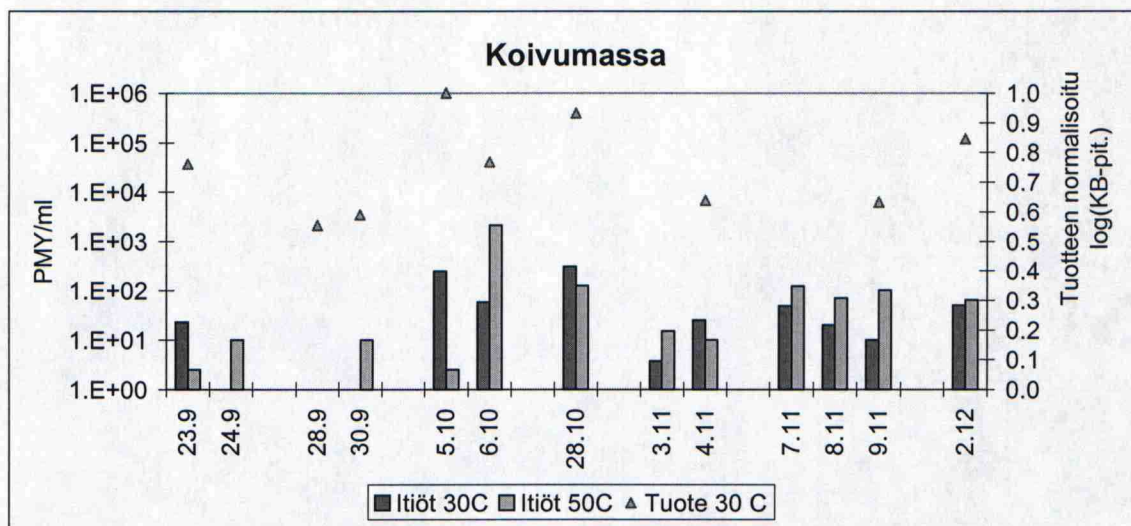
6.2.1 Massat

Koivumassan kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet sekä tuotteen normalisoidut kokonaisbakteeripitoisuudet on esitetty kuvissa 10 ja 11. Pitoisuudet ovat kohtuullisen

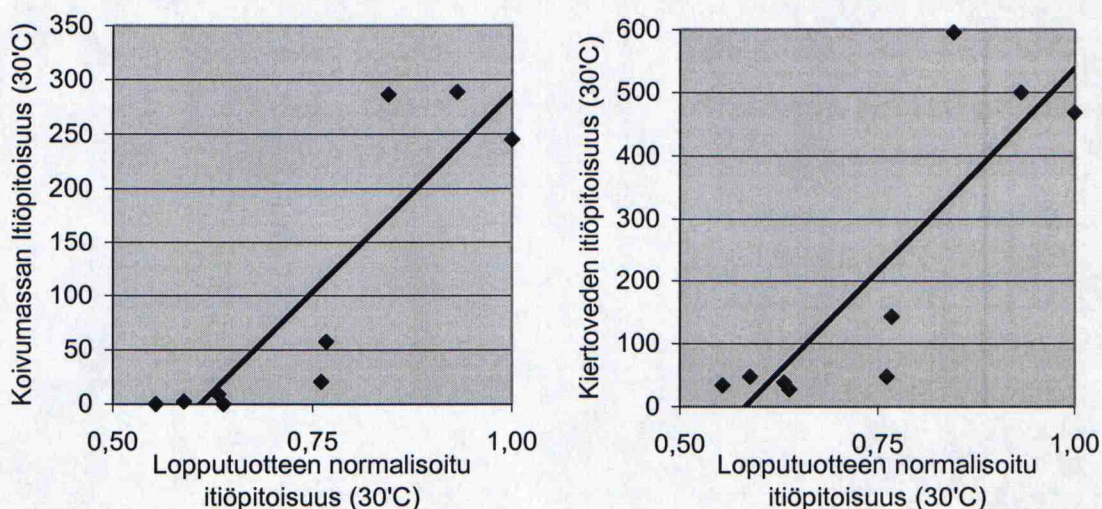
alhaisia ja termofiilisten 50°C:ssa kasvavien bakteerien määrät ovat pääsääntöisesti korkeampia kuin mesofiilisten 30°C:ssa kasvavien. Kokonaisbakteeripitoisuudet ovat seurantajakson loppupuolessa varsin alhaisia, itiöpitoisuuksissa ei voida havaita vastaavaa tason laskua. Koivumassan mesofiilisten 30°C:ssa kasvavien itiöiden pitoisuuden ja lopputuotteen mesofiilisten kokonaisbakteerien pitoisuuden välinen korrelaatiokerroin on yllättävän korkea, eli 0,88. Kuvassa 12 on esitetty koivumassan ja kiertoveden sekä lopputuotteen normalisoidut itiöpitoisuudet (30°C). Kuvaajista voidaan nähdä, että näytteenottokertoja on kuitenkin varsin vähän ja korrelaatio ei ole kovinkaan selkeä, ainoastaan suuntaa-antava. Koska koivumassan prosentuaalinen osuus kartonkiin käytettävistä raaka-aineista on kuitenkin varsin alhainen, näyttää todennäköiseltä, että korkea korrelaatiokerroin johtuu massan laimennukseen käytettävän kiertoveden erityisen suuresta vaikutuksesta koivumassan itiö- ja kokonaisbakteeripitoisuuksiin. Tähän voi olla syynä koivumassan alhainen ravinnepitoisuus ja suhteellisen nopea vaihtuvuus prosessissa. Jos koivumassa on mikrobiologisesti hyvin puhdasta ennen laimennusvetenä käytettävän kiertoveden lisäämistä ja kun ko. mikrobit eivät ehdi paljoakaan lisääntyä, itiöityä tai germinoitua, mikrobipitoisuudet koivumassassa vaihtelevat varsin tarkkaan saman suuntaisesti kuin kiertoveden mikrobipitoisuudet.



Kuva 10. Koivumassan kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

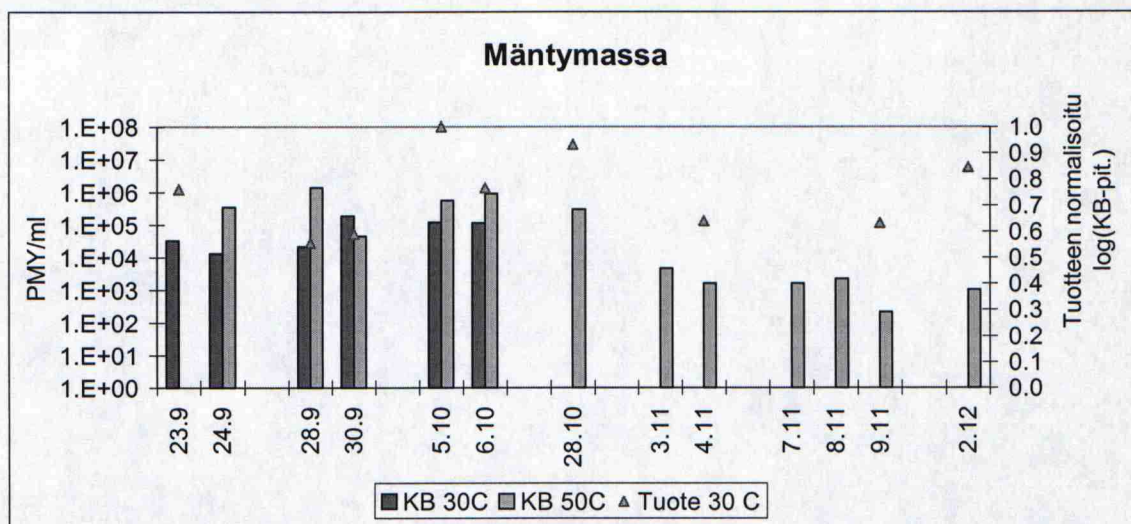


Kuva 11. Koivumassan itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

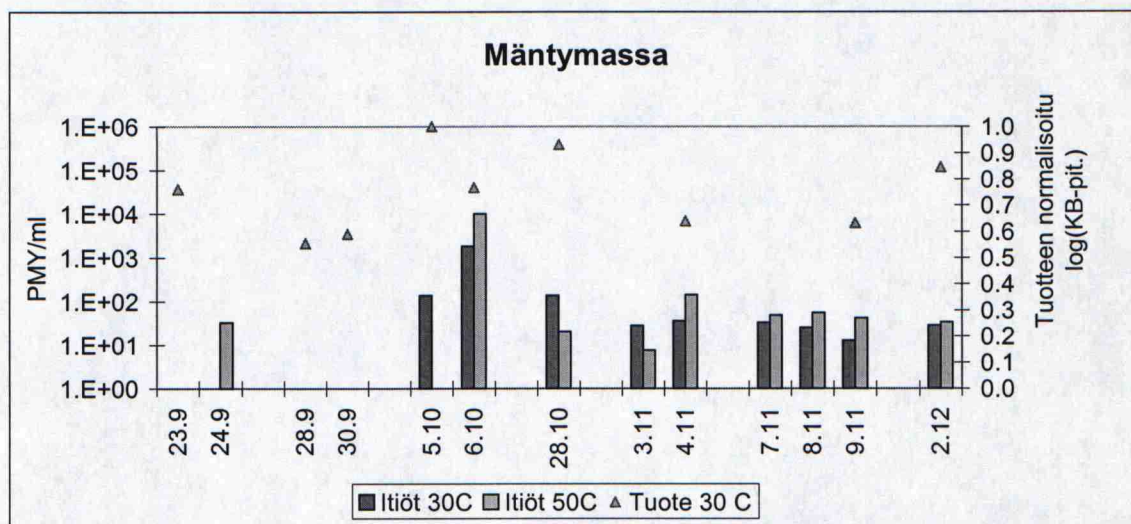


Kuva 12. Koivumassan ja kiertoveden itiöpitoisuudet (30°C) ja lopputuotteen normalisoidut itiöpitoisuudet (30°C)

Mäntymassan bakteeripitoisuudet on esitetty kuvissa 13 ja 14. Bakteeripitoisuudet ovat hieman korkeampia kuin koivumassassa, ja myös siinä seurantajakson loppupuolella otettujen näytteiden kokonaisbakteeripitoisuudet ovat hieman alkupuolen tuloksia alhaisemmat. Lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuus ei näytä seuraavan mäntymassan mikrobipitoisuuksia, kaikki korrelaatiokertoimet ovat alle 0,2.

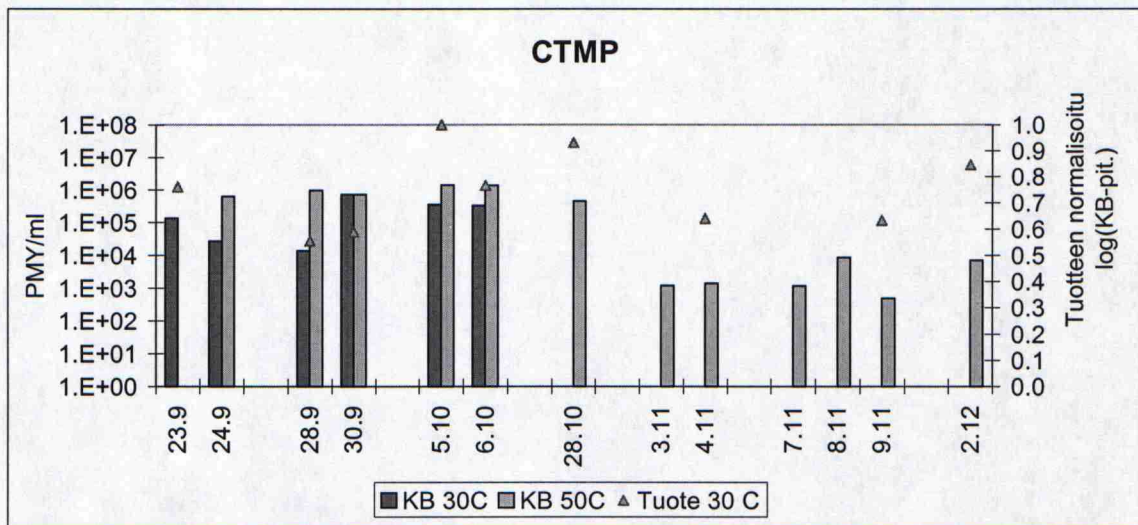


Kuva 13. Mäntymassan kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

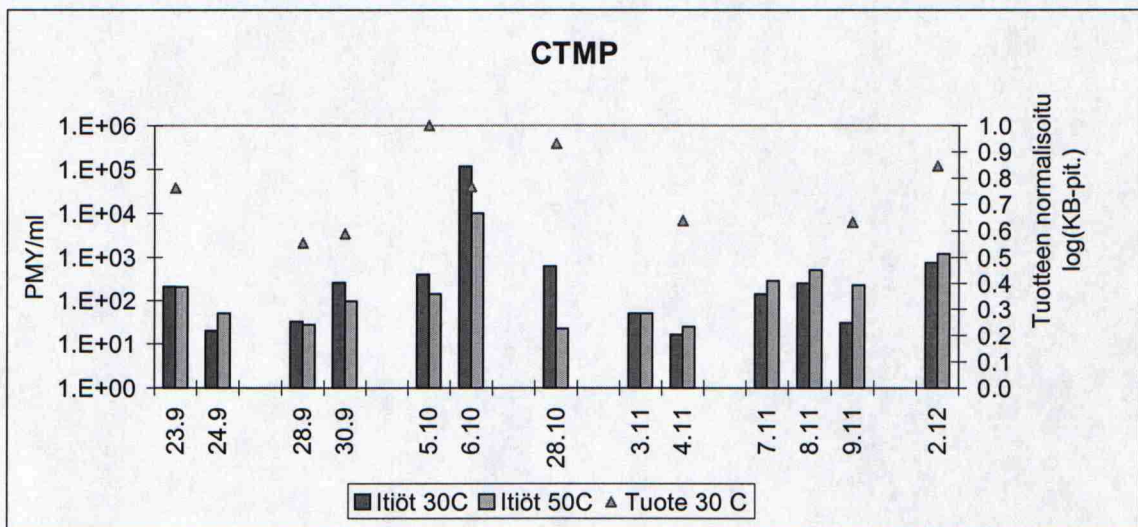


Kuva 14. Mäntymassan itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Kemihierteessä eli CTMP-massassa bakteeripitoisuudet ovat huomattavan korkeita. Tähän vaikuttanee kemihierteen sisältämä korkea ravinnepitoisuus. CTMP-massan sisältämät bakteeripitoisuudet on esitetty kuvissa 15 ja 16. Lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuus ei näytä seuraavan CTMP-massan mikrobipitoisuuksia, kaikki korrelaatiokertoimet ovat alle 0,3.



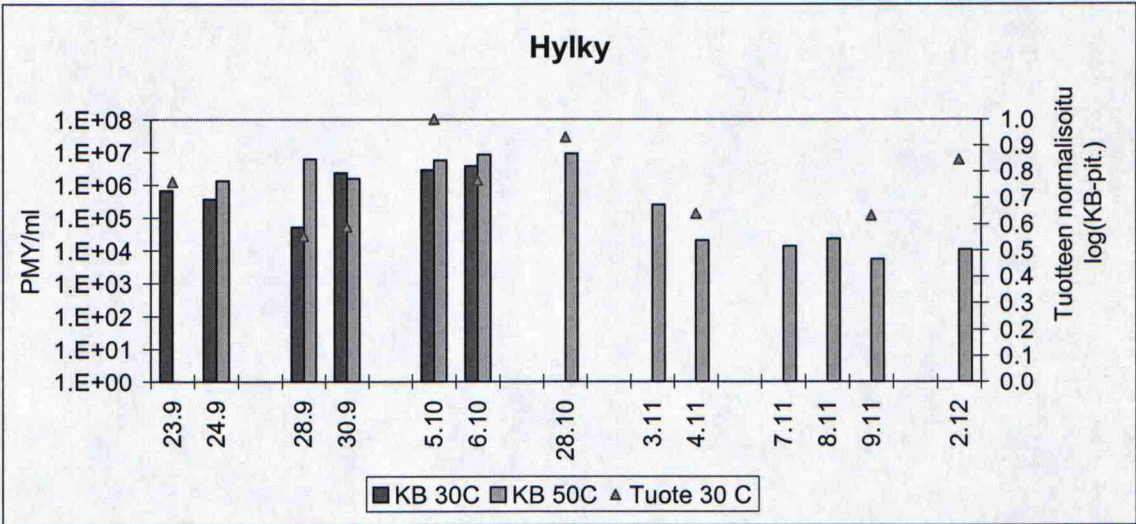
Kuva 15. CTMP-massan kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.



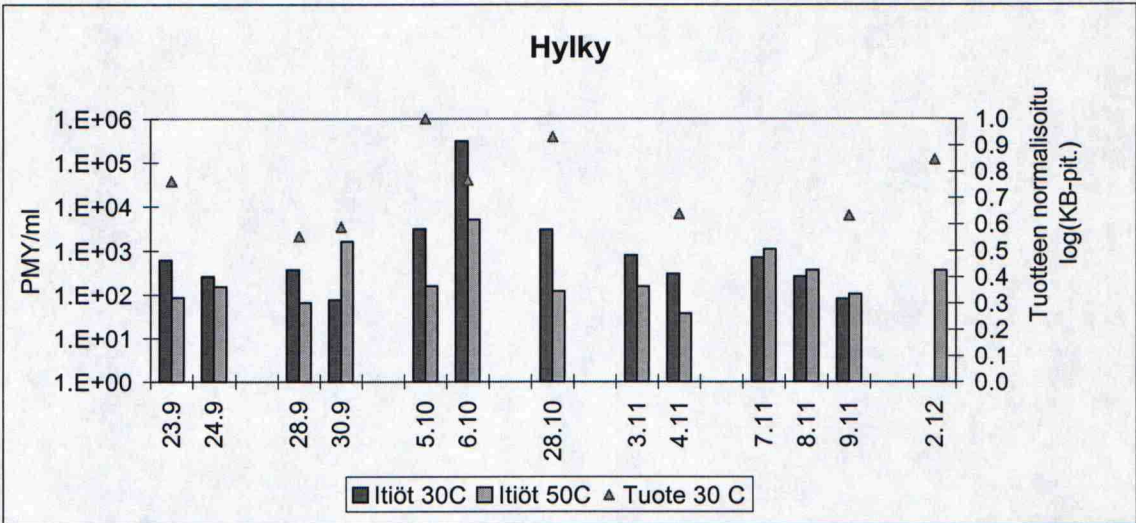
Kuva 16. CTMP-massan itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Hylkymassassa bakteeripitoisuudet ovat muita massoja korkeammat. Tämän aiheuttaa todennäköisesti se, että hylkymassassa on koivu-, mänty- ja CTMP-massojen lisäksi myös valmistusprosessissa lisättyjä lisäaineita, kuten tärkkelystä ja päällysteainepartikkeleita. Tärkkelys on bakteereille hyvää ravintoa ja päällysteainepartikkeleilla on bakteereita suojaavaa vaikutusta. Lisäksi hylkyssä on valmiiksi olemassa kohtuullisen paljon itiöiviä bakteereita, jotka ovat selviytyneet kuivatusosan läpi tuotetta valmistettaessa. Hylkyyn joutuvassa tuotteessa olevat bakteerikannat ovat valikoituneet sellaisiksi, että ne pystyvät selviytymään prosessilämpötiloissa, lisäksi nämä kannat saattavat

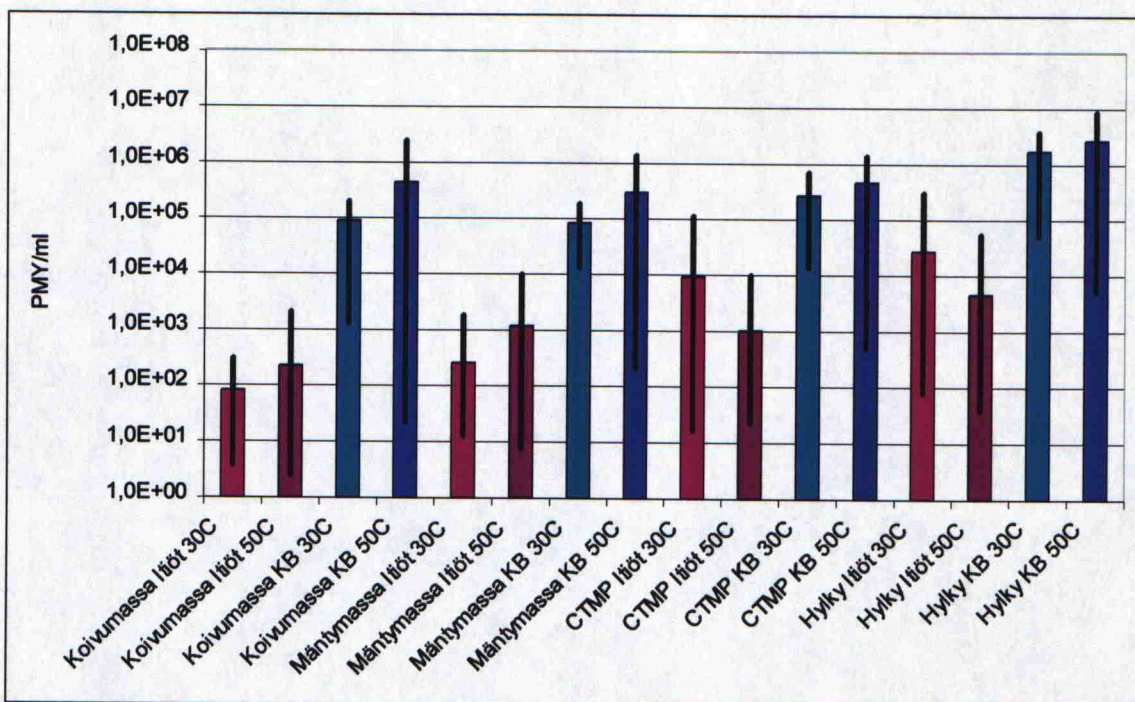
olla jossain määrin resistenttejä käytettäville biosideille. Erityisesti itiöpitoisuudet ovat hylkymassassa muita massoja korkeampia, ja tuotteen bakteeripitoisuuden voidaan nähdä myös seuraavan jossain määrin hylkymassan mesofiilisten bakteerien pitoisuutta. Korrelaatio kertoimeksi saadaan kuitenkin vain 0,50, joten korrelaatio ei vaikuta olevan kovinkaan hyvä. Hylkymassan kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet on esitetty kuvissa 17 ja 18.



Kuva 17. Hylkymassan kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.



Kuva 18. Hylkymassan itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.



Kuva 19. Massojen kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuusmäärittystulosten keskiarvot on esitetty kuvaajassa tolppina ja tulosten vaihteluväli on esitetty viivalla.

Kuvassa 19 on esitetty massojen kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuusmäärittystulosten keskiarvot ja vaihteluvälit. Vaihtelut mikrobipitoisuuksissa eri näytteenottokertojen välillä ovat hyvin suuria, jopa selkeästi suurempia kuin eri näytteiden mikrobipitoisuuksien keskiarvojen erot. Itiöpitoisuuksissa on havaittavissa ero 30°C:ssa ja 50°C:ssa kasvavien itiöivien bakteereiden määrien suhteissa. Valkaistuissa koivu- ja mäntymassoissa näyttää esiintyvän 50°C:ssa kasvavia itiöiviä bakteereita enemmän kuin 30°C:ssa kasvavia. CTMP- ja hylkymassoissa 50°C:ssa kasvavien itiöiden määrät ovat suurin piirtein samaa suuruusluokkaa kuin koivu- ja mäntymassoissa, mutta 30°C:ssa kasvavia itiöitä esiintyy näissä huomattavasti suurempia pitoisuuksia. Yksi selittävä tekijä tähän saattaa olla ravinteiden runsaampi esiintyminen CTMP- ja hylkymassoissa verrattuna koivu- ja mäntymassoihin. Eri massasäiliöistä otettujen näytteiden lämpötilat olivat niin lähellä toisiaan, että lämpötilojen erot eivät selitä itiöpopulaatioiden kokoeroja.

Kartongin valmistuksessa käytettyjen massojen mikrobipitoisuuksia tarkasteltaessa on tärkeää muistaa, että massat ovat itseasiassa pääosin vettä. Kuiva-ainepitoisuudet massatorneissa ja -säiliöissä ovat alle 10%, joten massojen laimennukseen käytettävien

vesien mikrobiologinen laatu määrää hyvin paljolti massojen mikrobipitoisuudet. Suoraan selluprosessista tai CTMP-prosessista tulevat massat ovat erittäin puhtaita, mutta massoja laimennetaan heti kartonkikoneelta tulevalla kiertovedellä, jotta massoja pystytään pumppaamaan. Käytetty laimennusvesi kontaminoi massat, ja mikrobit alkavat lisääntyä. Saavutettava mikrobipitoisuus kartonkikoneella massojen varastosäiliössä riippuu käytetyn laimennusveden laadusta, massan ravinne- ja happipitoisuudesta sekä lisättyjen mikrobisidien vaikutuksesta. Edellä mainittujen lisäksi erittäin paljon vaikuttaa myös massasysteemin viive eli aika, joka on ehtinyt kulua siitä kun massa on lähtenyt sellu- / CTMP-prosessista siihen kun massaa aletaan pumpata sekoitussäiliöön. Mitä pidempiä viiveet ovat, sitä pidempään mikrobeilla on aikaa lisääntyä, eli sitä korkeammiksi mikrobipitoisuudet nousevat. Viiveet vaihtelevat kartongin valmistusprosessissa erittäin paljon riippuen valmistettavista lopputuotelaaduista, katkojen ja seisokkien tiheydestä sekä kestosta ja muista satunnaisista tekijöistä.

Myös hylkymassan mikrobipitoisuus riippuu erittäin paljon yllä esitetyistä tekijöistä ja näiden lisäksi hyvin paljon myös päällystämättömän konehylyn ja (päällystetyn) rulla-hylyn määrien suhteesta, sekä näiden hylkymassojen alkuperäisestä kontaminaatiotasosta.

Konehylky on hylkymassaa, joka koostuu koko ajan koneelta tulevasta reunanauhasta sekä katkojen ja radan pääviennin aikana muodostuvasta hylkykartongista. Konehylky ei ole kulkenut kuivatusosan läpi ja siinä esiintyy runsaasti sekä vegetatiivisia mikrobeja että itiöitä. Konepulpperissa, jossa konehylky pulperoidaan eli hajotetaan kiertoveteen, on suuresti vaihtelevat viipymät. Mikäli katkoja ei ole, konehylky muodostuu ainoastaan reunanauhasta ja sitä siis kertyy hyvin hitaasti. Pään viennin aikana, eli kun paperirataa ajetaan koneen läpi kohti rullainta, koneen koko tuotanto päättyy jonkin aikaa konepulpperiin, joten tällöin konehylkyä muodostuu erittäin nopeasti erittäin paljon. Jos koneen kuivatusosalla esiintyy runsaasti ongelmia ja pään vienti on jostakin syystä erityisen vaikeaa, koneen tuotanto voi pahimmillaan päättyä konepulpperiin jopa tuntien ajan.

Erittäin suuri vaihtelu konepulpperin viipymäajoissa aiheuttaa suuria muutoksia myös konepulpperissa olevan massan mikrobiologiseen laatuun. Konehylyssä on massakomponenttien lisäksi vaihtelevassa määrin erilaisia lisäaineita, kuten massatärkkelystä,

spraytärkkelystä ja täyteainetta, joten siinä on yleensä selkeästi enemmän ravinteita kuin puhtaissa sellumassoissa.

Rullahylky on kartonkia, joka ei jostakin syystä täytä laatuvaatimuksia. Rullahylky voi olla yhteen tai useampaan kertaan päällystettyä ja se on siis ajettu koneen kuivatusosan läpi. Koneen kuivatusosalla lämpötilat ovat erittäin korkeita ja käytännössä kaikki vegetatiiviset mikrobit sekä homeitiöt tuhoutuvat kartongista ja jäljelle jää ainoastaan bakteeri-itiöitä. Täten rullahylkyyn on valikoitunut nimenomaan itiöiviä bakteereita ja siinä on runsaasti ravinteita, joten mikrobit saattavat lisääntyä siinä hyvinkin nopeasti. Laimennusveden mukana pulpperoituun rullahylkyyn tulee suuria määriä muitakin kuin itiöiviä bakteereita, mikä saattaa ajoittain vaikuttaa hylyn mikrobiologisen tilan kannalta huomattavasti enemmän kuin rullahylyn sisältämä itiöpitoisuus.

Massojen mikrobiologisen laadun varmistamiseksi on käytettävien laimennusvesien oltava riittävän puhtaita ja massasysteemin viiveiden on oltava mahdollisimman lyhyitä. Erityisesti hylkysysteemin ajotavoissa tulisi kiinnittää huomiota säiliöiden keskimääräisiin täyttöasteisiin ja viiveisiin. Mikrobien hallinnan kannalta rullahylkyä ei kannata pulpperoida varastoon yhtään enempää kuin mikä on prosessin tasaisen ajettavuuden kannalta ehdottoman tärkeää eli viiveet hylkysysteemissä tulee pitää mahdollisimman lyhyinä.

Erityisesti hylkysysteemiin on syytä lisätä normaalin ajon aikana mikrobintorjunta-ainetta, jotta mikrobipitoisuudet eivät pääse kohoamaan liian korkeiksi. Lisäksi mikäli massat uhkaavat jäädä säiliöihin seisomaan tavallista pidemmiksi ajoiksi esimerkiksi suunnitellun tai äkillisen koneen seisokin vuoksi, on järkevää säilöä kaikki massat tai ainakin CTMP- ja hylkymassa mikrobintorjunta-aineilla. Jos massat pääsevät pilaantumaa ja ne tästä huolimatta käytetään tuotannossa, ne saattavat helposti kontaminoida koko prosessin.

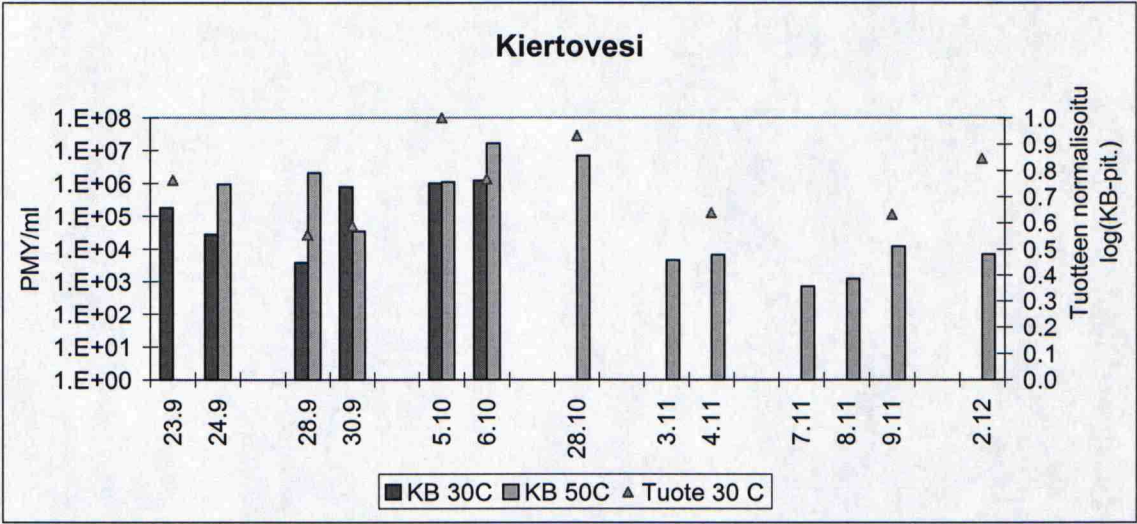
6.2.2 Kiertovesi, kiekkosuodin ja perälaatikot

Prosessissa käytettävistä vesistä likaisinta oli selkeästi kiertovesi. Sen bakteeripitoisuudet olivat noin 10 000-kertaisia kemiallisesti puhdistettuun veteen ja raakaveteen nähden ja noin 1 000-kertaisia lämpimään veteen verrattuna.

Kiertovesitornista otettujen kiertovesinäytteiden bakteeripitoisuudet on esitetty kuvissa 20 ja 21. Kiertovettä käytetään erityisesti massojen laimentamiseen, joten suuri määrä mikrobeja päätyy massoihin näiden laimennusvesien mukana. Kiertovesitornin ja kiertovesisäiliöiden tilavuus on tutkitulla koneella yhteensä miltei tuhat kuutiota, joten kiertoveden viipymäajat ovat normaalin ajonaikana huomattavan pitkiä. Kiertovedessä esiintyvät mikrobit ehtivät siis hyvin lisääntyä ja itiöityä säiliöissä. Selkeästi suurin osa bakteereista oli vegetatiivitilassa, itiöpitoisuudet olivat kohtuullisen alhaisia ja huomattavasti kokonaisbakteeripitoisuuksia pienempiä.

Mikrobiologiselta kannalta katsoen koko paperinvalmistusprosessi on paljolti kiertoveden pumppausta ja seisottamista eri säiliöissä siten, että siihen lisäillään välillä enimmillään noin 10% erilaisia puukuituja ja pieniä määriä muita aineita. Tämä on erityisen selkeästi havaittavissa tarkasteltaessa liitteessä B esitettyjä kiertoveden kokonaisbakteeripitoisuuksien ja kaikkien massanäytteiden ja perälaatikkonäytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien välisiä korrelaatiokertoimia. Korrelaatiokertoimista monet ovat yli 0,8 suuruisia.

Laimennusvetenä käytettävää kiertovettä tulee käsitellä mikrobintorjunta-aineilla, jotta sen mikrobipitoisuudet saadaan pidettyä riittävän alhaisina, muutoin tämä vesi toimii tehokkaana kontaminaation levittäjänä. Erityisesti hapettavien mikrobintorjunta-aineiden on havaittu olevan tehokkaita suurten kiertovesivolyymien käsittelyssä.

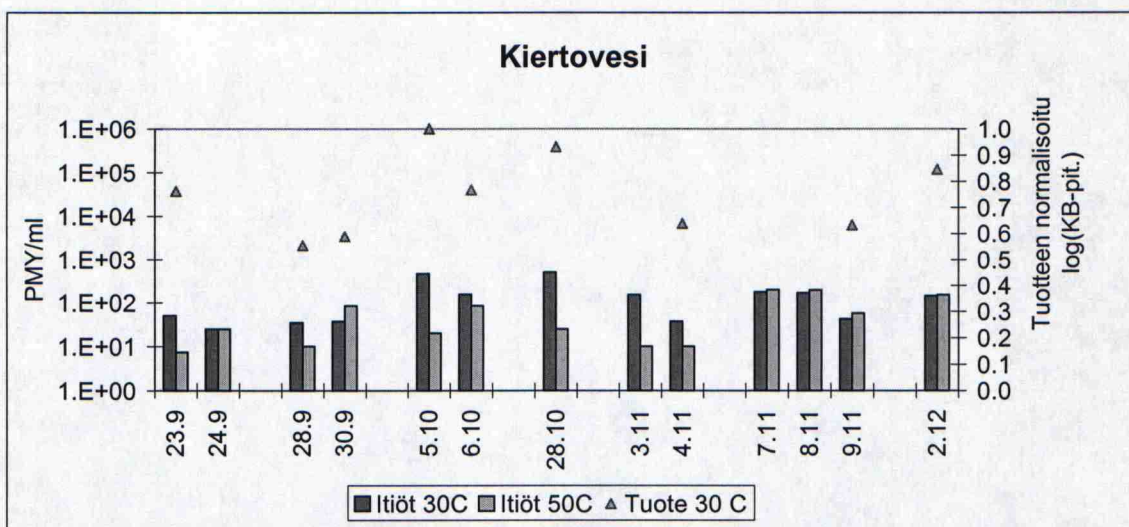


Kuva 20. Kiertovesitornista otetun kiertovesinäytteen kokonaisbakteeripitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Kuvissa 12 ja 21 esitetyt tuotteen bakteeripitoisuus ja kiertoveden mesofiilisten (30°C) itiöiden pitoisuus näyttävät seuraavan toisiaan kohtalaisen hyvin. Korrelaatiokertoimiksi näiden tulosten välille saatiin 0,89, minkä voidaan katsoa tarkoittavan kohtalaisen merkittävää korrelaatiota. Tämän korrelaatiolla taustalla voi olla se, että prosessissa esiintyvät bakteerit itiöityisivät erityisesti kun ravinteiden määrä laskee riittävän alhaiseksi. Tällaisen reagoinnin pitäisi näkyä erityisen hyvin juuri kiertovesitornissa olevan veden itiöpitoisuudessa. Oletettavasti kiertovesitornissa bakteerit ensisijaisesti jakautuvat ravinteiden määrän ollessa korkea, mutta ravinteiden määrän vähentyessä huomattavasti itiöivät bakteerit alkavat muodostaa itiöitä.

Toinen keskeinen vaikuttava tekijä voi olla liuenneen hapen määrä, eli myös hapen osapaineen lasku mikrobiologisen toiminnan seurauksena saattaisi laukaista itiön muodostuksen. Mikäli tämä olisi suurin itiöitymiseen vaikuttava tekijä voisi kuitenkin olettaa, että mesofiilisen (30°C) kokonaisbakteeripitoisuuden ja itiöpitoisuuden korrelaatiokerroin olisi ainakin hieman korkeampi kuin nyt saatu 0,26. Fakultatiivisten bakteerien esiintyminen saattaa toki peittää tämän ilmiön. Nyt käytössä ollut näytteenottosysteemi oli rakenteeltaan sellainen, että näyte ilmastui väkisin näytettä otettaessa. Mikäli näyte saataisiin otettua siten, ettei ilmaa pääsisi sekoittumaan näytteeseen, voitaisiin mahdollisesti nähdä happipitoisuuden vaikutus itiöitymiseen mittaamalla hapetuspelkistyspotentiaali tai happipitoisuus yhtäaikaan kokonaisbakteeri-, anaerobi- ja itiöpitoisuuden kanssa. Muut korrelaatiokertoimet lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa olivat 0,06 / Itiöt 50°C ja 0,23 / KB50°C.

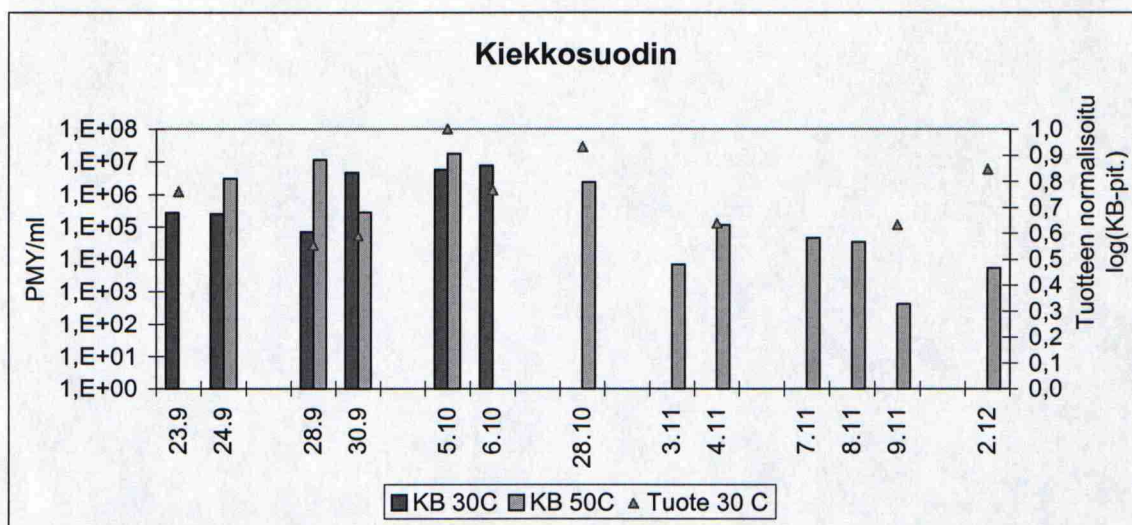
Kuten liitteessä B olevasta kiertoveden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien sekä massanäytteiden ja perälaatikkonäytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien välisiä korrelaatiokertoimet esittävästä taulukosta havaitaan, kiertoveden itiöpitoisuudet eivät korreloi massa- ja perälaatikkonäytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien kanssa. Poikkeuksia edellä mainitusta ovat ainoastaan koivumassa ja kiekkosuotimen massakakku.



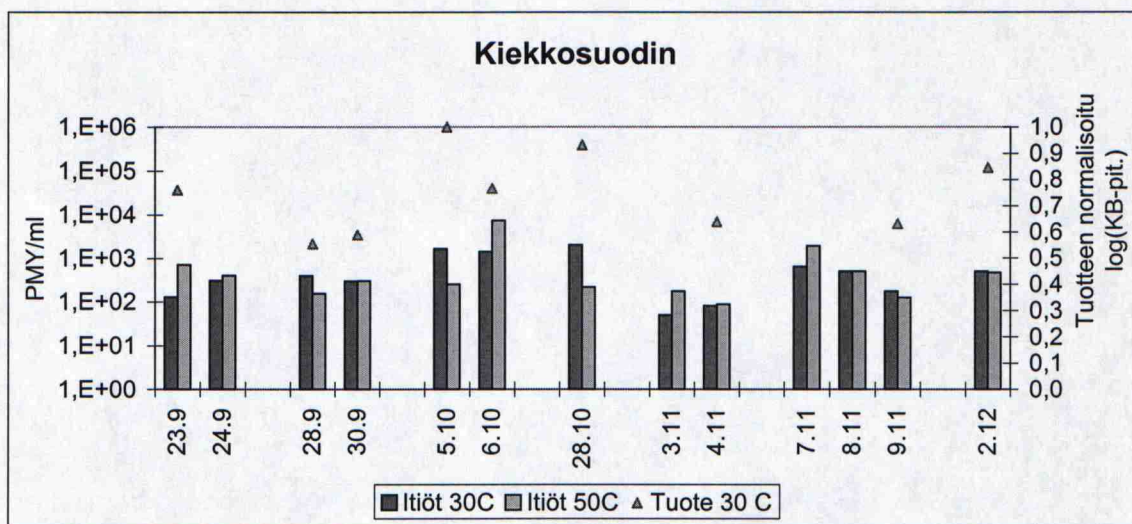
Kuva 21. Kiertoveden itiöpitoisuudet (kasvatustemperatuurit 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatustemperatuurilla 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Kiekkosuotimella koneen lyhyestä kierrosta pitkään kiertoon palautettavasta kierto-vedestä pyritään poistamaan hienoinesta ja kuituja lisäämällä veteen ensin massaa (tässä tapauksessa koivumassaa) ja suodattamalla sitten tätä laimeaa kuitusulppua pyöri-vien suodatinkangassegmenttien läpi. Tällöin muodostuvaan massakakkuun retentoituu suuri osa hienoineksesta, sekä hydrofobisten ominaisuuksiensa vuoksi todennäköisesti ainakin osa bakteeri-itiöistä.

Kiekkosuotimelle syötettävä kierto-vesi on pääosin viirakaivojen ylijuoksuvettä, ja erityisesti kiekkosuotimen kakun termofiilisten (50°C) itiöiden ja perälaatikko-näytteiden itiöpitoisuuksien välinen korrelaatio on hyvin korkea, ko. kertoimet ovat välillä 0,77...0,97. Kiekkosuotimen kakun sekä massa- ja perälaatikkonäytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiokertoimet on esitetty liitteessä C Kiekkosuotimen massakakun sisälmämät kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet on esitetty kuvissa 22 ja 23.



Kuva 22. Kiekkosuotimen massakakun kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

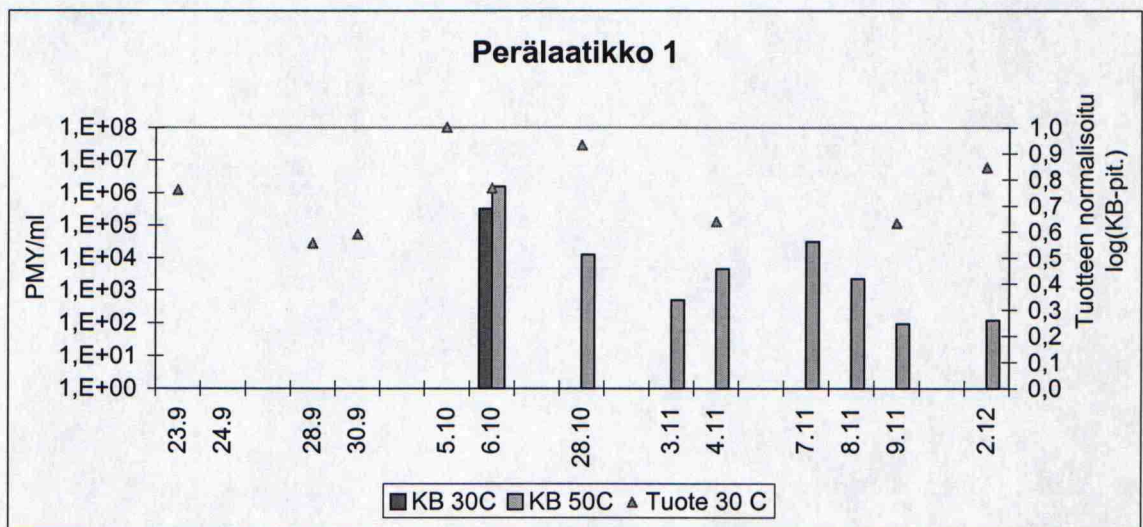


Kuva 23. Kiekkosuotimen massakakun itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

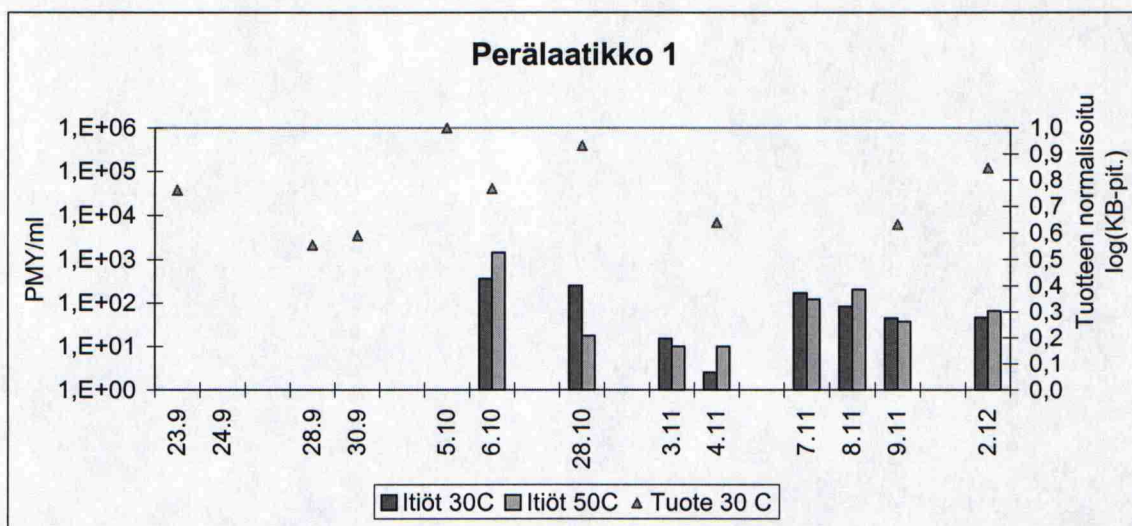
Käytännössä koneen lyhyt kierto rakentuu pääperiaatteiltaan siten, että massa- ja lisäainesäiliöistä pumpataan tavaraa sekoitussäiliöön, mistä reseptuurin mukainen massasulppu pumpataan edelleen konesäiliöön. Konesäiliöstä massasulppua pumpataan viirakaivon pohjalle erittäin voimakkaan sekoittimen viereen ja sieltä merkittävässä määrin viiravedellä laimentunut massasulppu pumpataan perälaatikkoon. Perälaatikosta laimeaa massasulppua syötetään viiralle, jota voi äärimmäisen yksinkertaistettusti pitää

liikkuvana suodatinkankaana. Suuri osa kuiva-aineesta jää viiralle ja jatkaa matkaansa kohti puristin ja kuivatusosaa, ja suuri osa vedestä suotautuu rainan ja viirakankaan läpi viira-altaaseen ja virtaa sieltä edelleen viirakaivoon. Koska konesäiliöstä pumpattavassa massasulpussa on enemmän vettä kuin mitä jatkaa matkaansa paperirainan mukana viiralla puristin osalle päin, viirakaivosta poistetaan osa vedestä ylikkaatona kiertovesisäiliöön. Kiertovesisäiliön vedestä käytetään osa suoraan laimennusvetenä, mutta suurin osa siitä pumpataan kiekkosuotimen kautta kiertovesitorniin tai käytettäväksi esimerkiksi suihkuvetenä (eli mm. viirojen pesuvetenä).

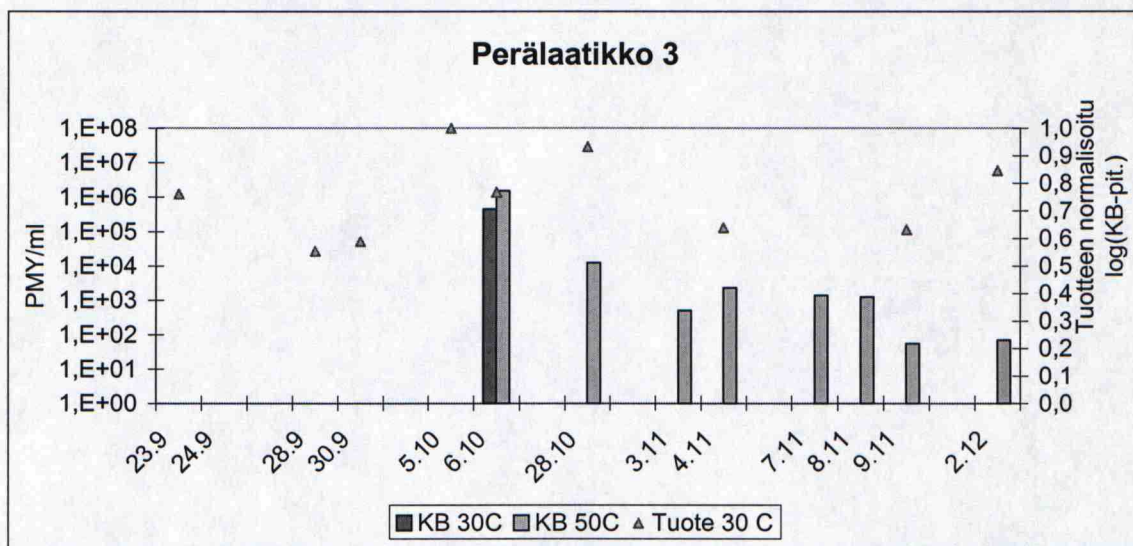
Perälaatikoilla 1 ja 3 on yhteiset sekoitus- ja konesäiliöt, joten niiden sisältö on käytännöllisesti katsoen identtinen. Perälaatikkojen 1 ja 3 mikrobipitoisuudet ovat käytännössä samalla tasolla keskenään. Perälaatikon 1 kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet on esitetty kuvissa 24 ja 25, ja perälaatikon 3 kuvissa 26 ja 27.



Kuva 24. Perälaatikko 1:n kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

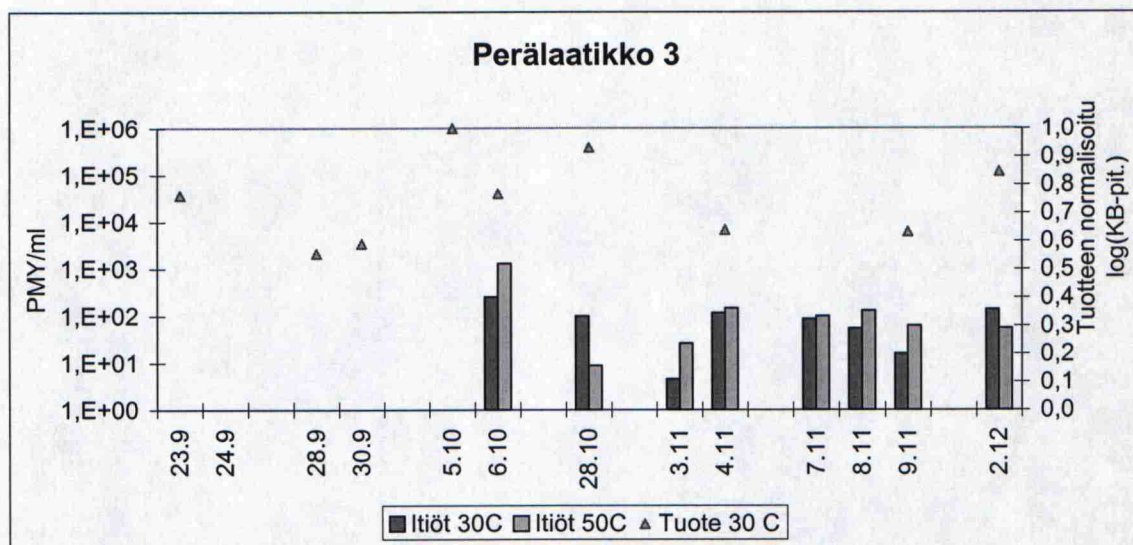


Kuva 25. Perälaatikko 1:n itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.



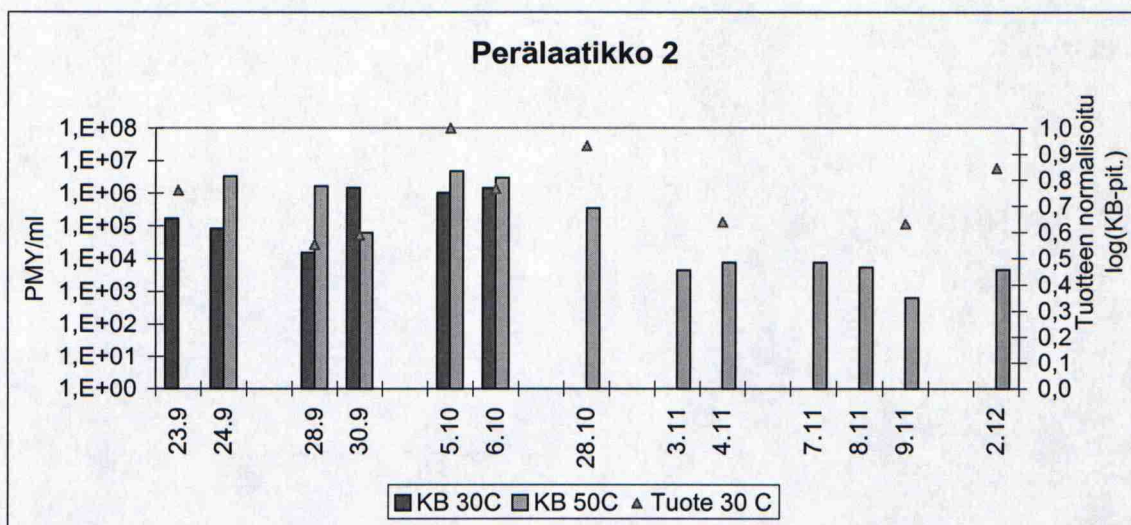
Kuva 26 Perälaatikko 3:n kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Erotuksena perälaatikoihin 1 ja 3 perälaatikkoon 2 syötetään muiden massojen ja lisäaineiden lisäksi runsaasti myös CTMP- ja hylkymassaa. Edellä mainittu onkin mitä ilmeisimmin pääasiallinen syy siihen, että kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet ovat perälaatikko 2:ssa korkeammalla tasolla kuin perälaatikko 1:ssä ja 3:ssa. Perälaatikoiden syöttövirtaukset riippuvat tuotettavasta kartonkilaadusta. Paksumpia laatuja tuottaessa perälaatikko 2:n syöttö voi olla huomattavasti suurempi kuin perälaatikoiden 1 ja 3 syötöt yhteensä. Tutkimuksissa saadut perälaatikko 2:n kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet on esitetty kuvissa 28. ja 29.

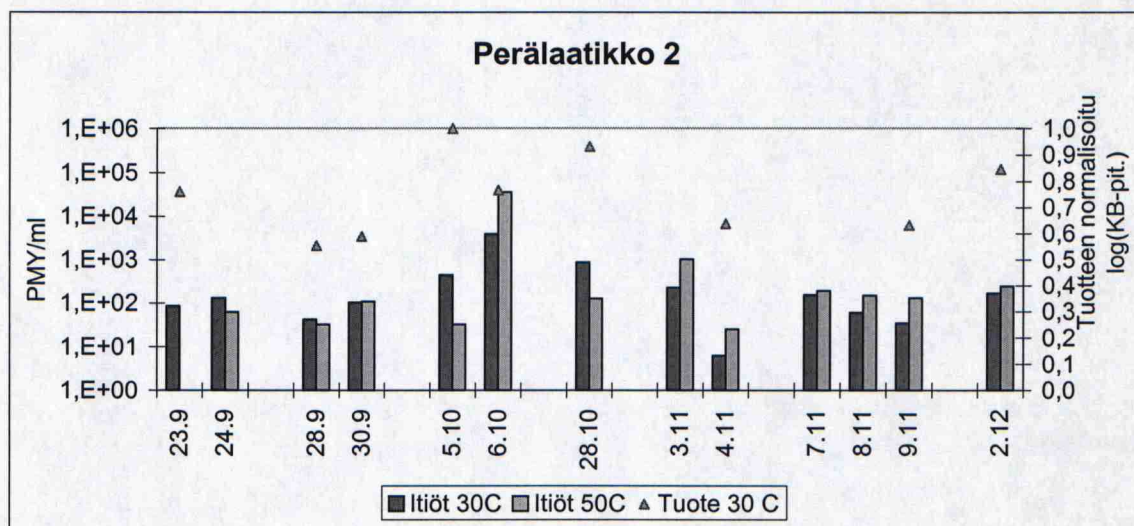


Kuva 27. Perälaatikko 3:n itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Voitaisiin olettaa, että perälaatikkonäytteiden itiöpitoisuuksien ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden tulisi korreloida keskenään miltei täydellisesti. Syy tähän on se, että perälaatikon jälkeen lisättävien ainesten eli spraytärkin, pintaliiman, taustankostutusveden ja päällystyspatojen mikrobitasot ovat hyvin alhaisia, joten käytännössä kaikkien lopputuotteeseen asti elinkelpoisina selviävien mikrobien olisitultava perälaatikkomassan mukana. Korrelaatiokertoimet perälaatikkonäytteiden ja lopputuotteen mikrobipitoisuuksien välillä ovat kuitenkin välillä 0,02...0,57, eli odottamattoman pieniä. Tämän täytynee johtua siitä, että perälaatikkojen näytteet eivät jostakin mekaanisesta syystä ole edustavia, tai siitä, että näytteet ovat hyvin laimeita (kuiva-ainepitoisuus noin 1%) ja tehtävät mikrobiologiset määitykset perälaatikkonäytteistä ja lopputuotteesta ovat suhteellisen epätarkkoja. Liitteessä D on esitetty osittain erillisten näytteenottokierrosten tuloksia ja näiden tulosten välisiä korrelaatiokertoimia. Näiden tulosten perusteella voidaan havaita, että perälaatikko- ja lopputuotteenäytteiden itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiot ovat kuitenkin varsin suuria, mutta käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus, tarkkuus ja herkkyys eivät ole aivan riittäviä.



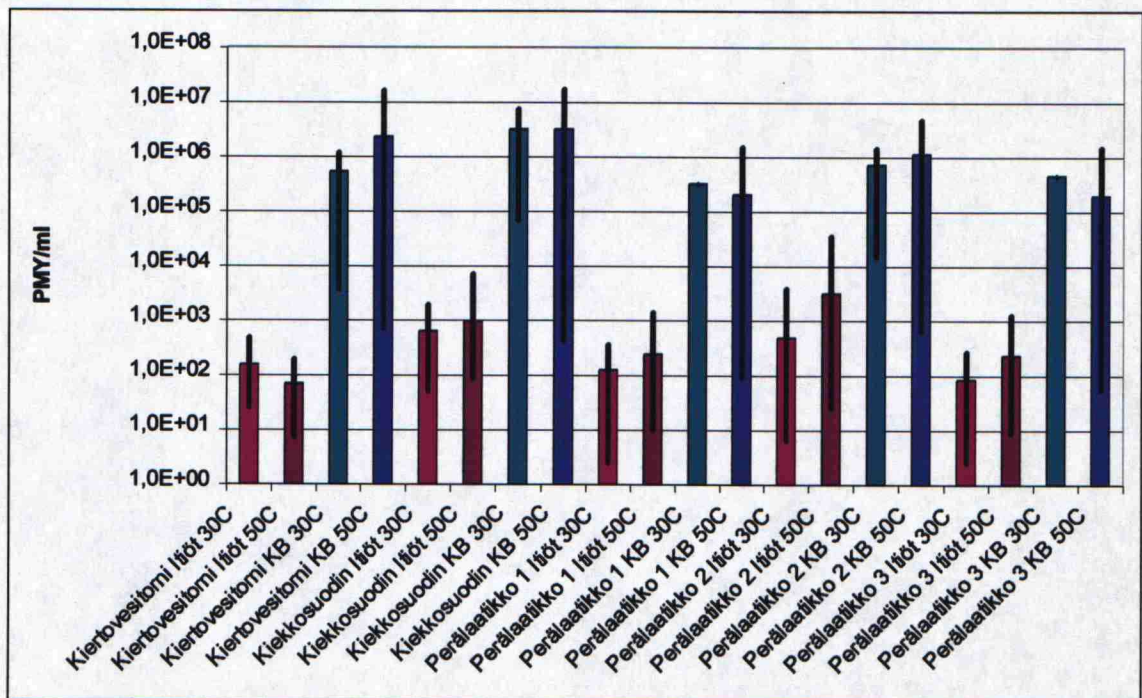
Kuva 28. Perälaatikko 2:n kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.



Kuva 29. Perälaatikko 2:n itiöpitoisuudet (kasvatuslämpötilat 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatuslämpötila 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Kuvassa 30 on esitettyä kiertovesitornin, kiekkosuotimen kakun ja perälaatikoiden keskimääräiset mikrobipitoisuudet. Kuvasta nähdään, että erityisesti termofiilisten kokonaisbakteerien määrissä on hyvin paljon vaihtelua. Tarkasteltaessa kuvan 30. tuloksia yhdessä kuvien 19 ja 34 eli muiden keskimääräisten mikrobipitoisuuksien kanssa, havaitaan hylkymassan ja kiekkosuotimen kakun olevan kaikkein kontaminoituneimpia nyt tutkituista prosessinäytteistä. Hylkymassan vaikutus havaitaan siinä, että

perälaatikko 2:n keskimääräiset mikrobipitoisuudet ovat korkeampia kuin perälaatikoiden 1 ja 3.



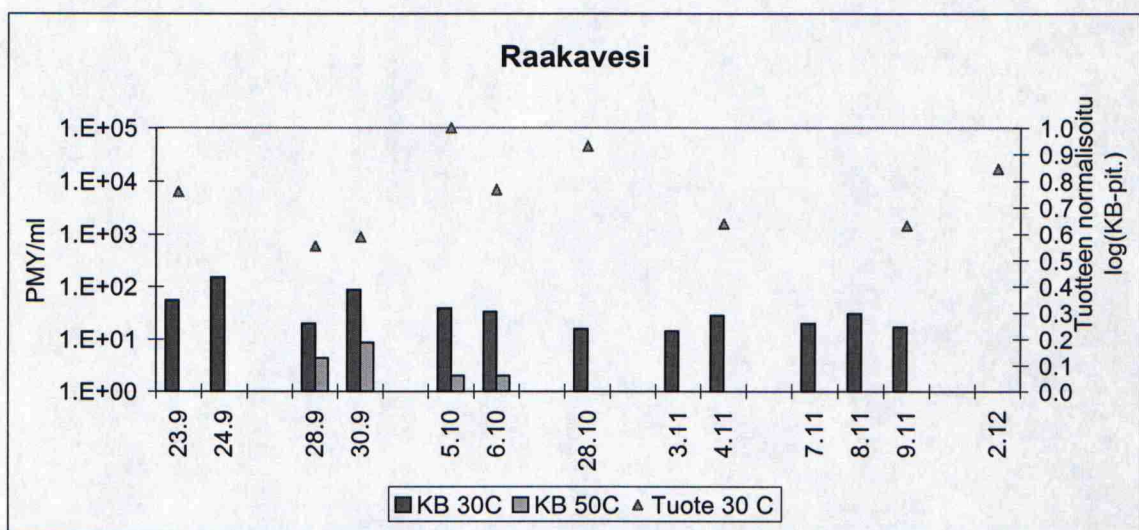
Kuva 30. Kiertovesitorni, kiekkosuotimen kuitukakku ja perälaatikko näytteiden keskimääräiset kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet 30°C:ssa ja 50°C:ssa on esitetty tolppina, lisäksi määrittämissä saadut suurimmat ja pienimmät arvot on esitetty viivalla.

Perälaatikon syöttövirtaukseen tai muualle lyhyeen kiertoon syötetty mikrobintorjunta-aine ei todennäköisesti ehdi vaikuttamaan lyhyessä kierrossa oleviin itiöihin lyhyen kierron nopeasta vaihtuvuudesta johtuen. Varsinaisesti itiöiden hallinta kannattaakin tehdä paperikoneen pitkässä kierrossa, joko kiertovettä tai hylkyä tai mieluummin molempia tehokkaasti mikrobintorjunta-aineilla käsitellen. Bakteeri-itiöt kestävät mikrobintorjunta-aineita kohtuullisen hyvin, joten itiöiden tuhoamiseen tähtäävissä käsittelyissä on ehdottoman tärkeää, että annosteltavat torjunta-aine pitoisuudet ovat riittävän korkeita ja kontaktiaika on riittävän pitkä. Itiöiden resistiivisyydestä johtuen itiöiden torjunta on suurelta osin suunnattava vegetatiivisessa muodossaan olevien itiöivien bakteereiden torjuntaan. Lyhyen kiertoon syötettävien mikrobintorjunta-aineiden pääasiallinen tarkoitus on normaalisti mikrobiologisen limoittumisen hallinta.

6.2.3 Prosessiin sisään tulevat vedet

Raakavesi on pintavettä, joka on puhdistettu saostamalla ja pumppaamalla se hiekkasuodattimien läpi. Raakaveden käyttökohteita oli tutkitulla kartonkikoneella varsin vähän, lähinnä raakavesi toimi tiettyjen vesisäiliöiden varatäydennysvetenä sekä pesu- ja huuhteluvetenä. Raakaveden kokonaisbakteeripitoisuudet olivat alhaisia, pitoisuudet on esitetty kuvassa 31. Mesofilisten bakteereiden pitoisuudet olivat pääosin hieman alle sata pmy/ml ja termofiilisten bakteereiden pitoisuudet olivat alle kymmentä pesäkettä muodostavaa yksikköä millilitrassa. Sinänsä pitoisuudet ovat siis hyvinkin alhaisia, mutta raakaveden mukana prosessiin tulevat mikrobit voivat kuitenkin olla hyvin ongelmallisia, koska ne ovat luonnon vesistöön valikoituneita bakteereita ja pystyvät siksi lisääntymään tehokkaasti hyvinkin ravinneköyhissä olosuhteissa.

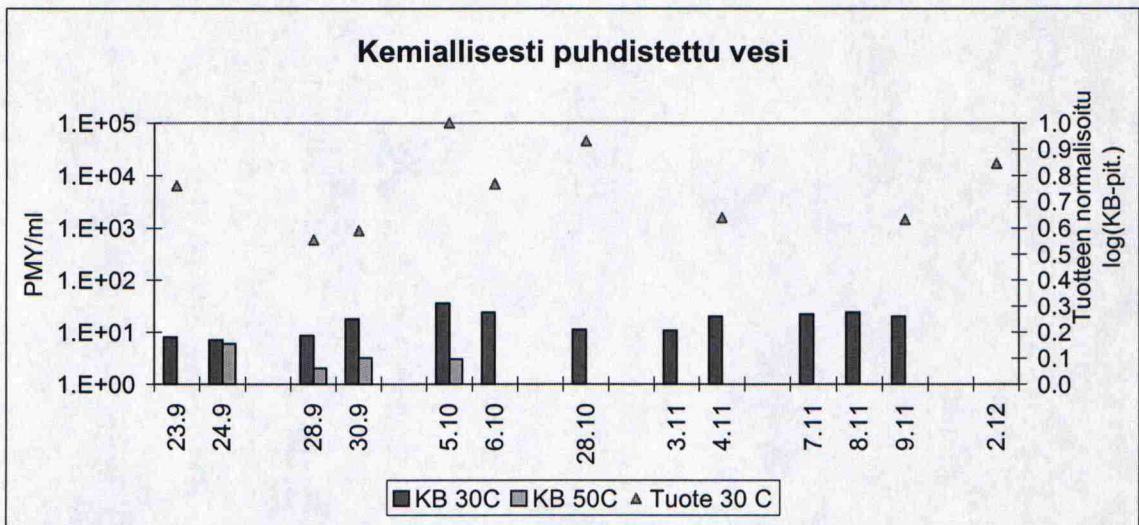
Kuvassa 34 on esitetty prosessiin sisään tulevien eri vesijakeiden itiöpitoisuudet. Kaikissa tehdyissä määrittelyissä raakaveden, kemiallisesti puhdistetun raakaveden ja lämpimän veden itiöpitoisuudet jäivät keskimäärin alle yhteen pesäkkeen muodostavaan yksikköön millilitrassa. Itiöpitoisuudet olivat siis erittäin alhaisia ja siten jotakuinkin merkityksettömiä.



Kuva 31. Raakaveden kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatustemperatuurit 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatustemperatura 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

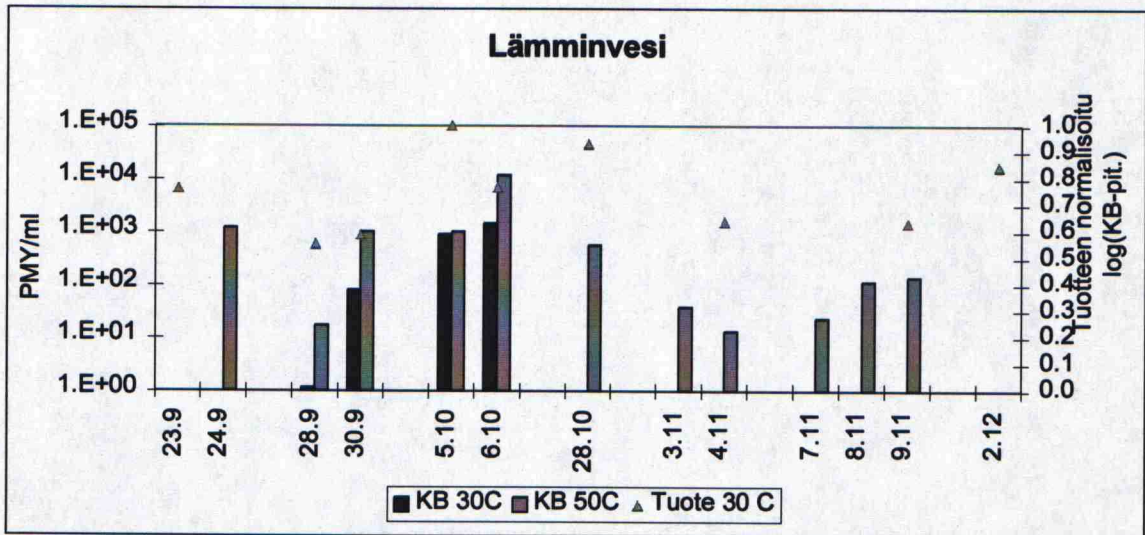
Kemiallisesti puhdistettu raakavesi on raakavettä, joka on puhdistettu lisäämällä siihen kohtalainen määrä hapettavaa kemikaalia. Kokonaisbakteeripitoisuudet kemiallisesti puhdistetussa raakavedessä eivät kuitenkaan olleet merkittävästi alhaisempia kuin

raakavedessä, mikä voidaan havaita kuvassa 34 esitetyistä tuloksista ja vertailemalla kuvaa 31 ja kuvaa 32, missä on esitetty kemiallisesti puhdistetun raakaveden kokonaisbakteeripitoisuudet. Kemiallisesti puhdistettua raakavettä käytetään prosessissa erityisesti konetta käynnistettäessä seisokin jälkeen. Tällöin suurimmat vesisäiliöt ja viirakaivot täytetään kemiallisesti puhdistetulla vedellä tai lämpimällä vedellä tai näiden yhdistelmällä. Kemiallisesti puhdistettu vesi näytti tehtyjen määritysten perusteella olevan varsin puhdasta, mutta siinä esiintyvät mikrobi kannat ovat samaisia hyvin ravinneköyhiin olosuhteisiin tottuneita mikrobeja kuin raakavedessäkin.

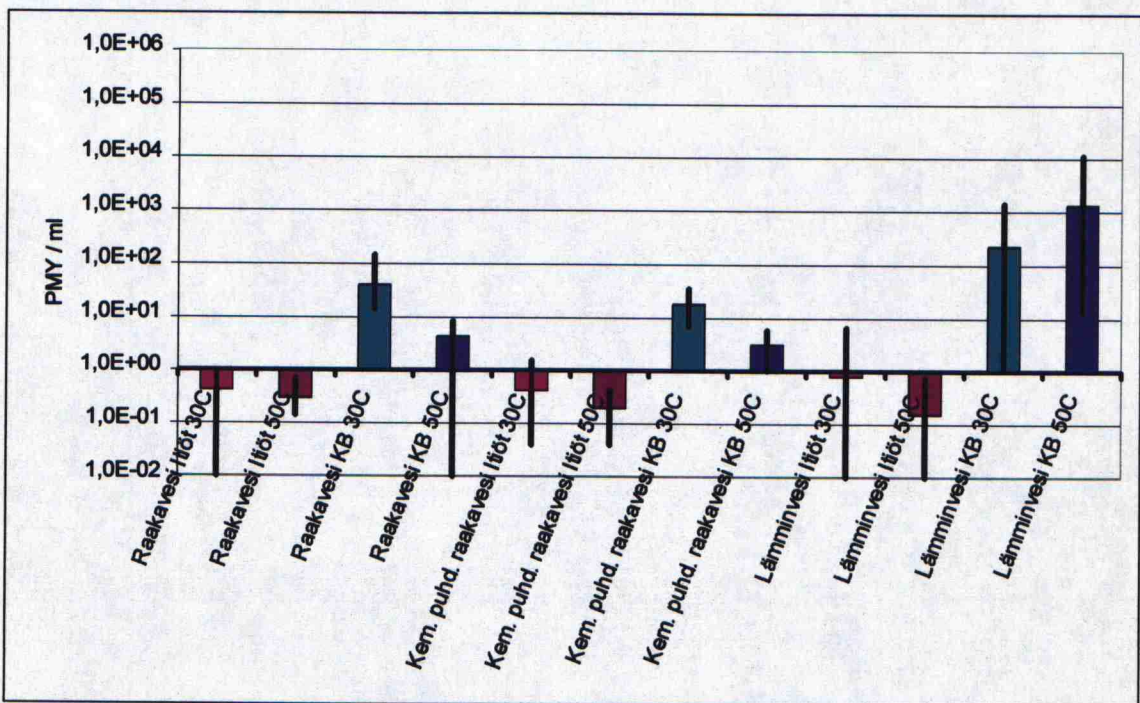


Kuva 32. Kemiallisesti puhdistetun veden kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatustemperatuurit 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatustemperatura 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.

Lämminvesi on pääasiassa lämmönvaihtimien kautta ajettua kemiallisesti puhdistettua vettä. Lämpötila säiliössä on noin 50°C. Korkeampi lämpötila on ilmeisesti innostanut bakteerit kasvuun, koska kokonaisbakteeripitoisuudet ovat lämpimässä vedessä korkeampia kuin kemiallisesti puhdistetussa vedessä. Erityisesti termofiilisiä 50°C:ssa kasvavia bakteereita esiintyy lämpimässä vedessä enemmän kuin kemiallisesti puhdistetussa vedessä. Lämpimän veden kokonaisbakteeripitoisuudet on esitetty kuvassa 33. Itiöpitoisuudet ovat yhtä alhaisella tasolla lämpimässä vedessä kuin raakavedessä ja kemiallisesti puhdistetussa vedessäkin. Lämpimän veden pääasialliset käyttökohteet tutkitulla kartonkikoneella olivat korkeapainesuihkut ja edellä mainittu vesisäiliöiden täyttö ja täydennys starttien yhteydessä.



Kuva 33. Lämpimän veden kokonaisbakteeripitoisuus (kasvatustemperatuurit 30°C ja 50°C) ja lopputuotteen kokonaisbakteeripitoisuuden (kasvatustemperatuur 30°C) logaritmin normalisoidut arvot.



Kuva 34. Raakaveden, kemiallisesti puhdistetun raakaveden ja lämpimän veden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet (kasvatustemperatuurit 30°C ja 50°C). Pitoisuus 1,0E-01 pmy/ml tarkoittaa 1pmy/10ml ja 1,0E-02 pmy/ml tarkoittaa 1 pmy/100ml.

Kuten kuvasta 34 voidaan nähdä bakteeripitoisuudet prosessiin sisään tulevissa vesijakeissa olivat hyvällä alhaisella tasolla. Pitoisuuksien ero raakavedessä ja kemiallisesti puhdistetussa raakavedessä oli yllättävän pieni, hapettava mikrobintorjunta käsittely on ilmeisesti ollut varsin hillitty. Itiöitä ei näissä vesijakeissa esiintynyt

merkittäviä määriä. Korrelaatiokertoimet näiden tulosten ja lopputuotteen tai muiden prosessinäytteiden mikrobipitoisuuksien kanssa olivat olemattoman pieniä.

6.2.4 Tärkeimmät lisäaineet ja päällystyspastat

Keskeisimpien lisäaineiden ja päällystyspastojen kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuuksien (30 ja 50°C) määritystulokset on esitetty liitteessä E. Määrittelyissä suurin osa mikrobipitoisuuksista jäi alle määritysrajan.

Massatärkkelyksessä korkein havaittu kokonaisbakteeripitoisuus (30°C) oli 17 pmy/ml ja kaikki itiöpitoisuudet olivat alle 20 pmy/ml, joten massatärkkelystä voitiin pitää mikrobiologisesti puhtaana. Massatärkkelys valmistetaan tärkkelyslietteestä kuumentamalla se erittäin nopeasti lyhyeksi aikaa reilusti yli sata asteiseksi. Ajokierrossa massatärkkelyksen lämpötila oli yli 70°C, joten suurien mikrobipitoisuuksien esiintyminen olisi ollut varsin epätodennäköistä.

Pintaliimassa kaikki näytteet yhtä lukuunottamatta olivat mikrobiologisesti käytännöllisesti katsoen puhtaita, ja tuo yksi poikkeuskin oli erittäin todennäköisesti määrittelyvirhe. Pintaliima on keitettyä tärkkelyslietettä, johon on lisätty pieniä määriä tiettyjä lisäaineita.

Spraytärkkiä ei käytetty läheskään kaikissa lopputuote lajeissa, joten siitä saatiin näytteet vain kolmella näytteenottokierroksella. Lisäksi näytteiden ja siirrostettujen maljojen kanssa sattui muutamia sekaannuksia, joten kaikilla määrittelykerroilla ei saatu tuloksia kokonaisbakteeripitoisuuksista molemmissa (30 ja 50°C) kasvatuslämpötiloissa. Yhdellä näytteenottokerralla mesofiilisten kokonaisbakteerien pitoisuus oli 2400 pmy/ml ja toisella termofiilisten kokonaisbakteerien pitoisuus oli 30°C, itiöpitoisuudet olivat kuitenkin kaikilla kolmella näytteenottokerralla alle 20 pmy/ml molemmissa kasvatuslämpötiloissa. Spraytärkki vaikutti siis olevan kohtalaisen puhdasta, mutta kuitenkin hieman riskialtista raaka-ainetta. Spraytärkki on lietettyä keittämätöntä tärkkelystä, jota sumutetaan viiraosalla erikerroksia yhdistettäessä parantamaan palstautumislujuutta.

Neutraaliliimassa korkein havaittu mesofiilinen kokonaisbakteeripitoisuus oli 10 pmy/ml ja kaikki muut pitoisuudet olivat alle määritysrajan joka oli eri määrityskerroilla 10, 20 tai 100 pmy/ml. Neutraaliliima oli siis käytännössä mikrobiologisesti puhdasta. Neutraaliliimaa lisättiin tutkitulla kartonkikoneella parantamaan lopputuotteen lujuusominaisuuksia.

Päällystyspastan ajosäiliöissä 2 ja 4 kokonaisbakteeripitoisuudet vaihtelivat alle sadan ja 3180 pmy/ml:n välillä, ja itiöpitoisuudet olivat alle 20 pmy/ml, paitsi yhdessä näytteessä oli mesofiilisiä itiöitä 25 pmy/ml. Mikrobipitoisuudet olivat siis varsin alhaisia ja mikrobin torjuntaohjelma näytti toimivan. Päällystyspastan on tietyissä tilanteissa havaittu olevan erittäin merkittävä itiökontaminaation lähde, joten pastojen mikrobiologiseen käsittelyyn ja seurantaan tulee panostaa riittävästi. Käsiteltävät tilavuudet ovat kuitenkin kohtuullisen pieniä verrattuna esimerkiksi hylkysysteemin tilavuuteen, joten pastojen käsittelyssä ei kannata säästellä liikaa. Pastojen valmistuksen raaka-aineiden mikrobiologinen laatu voi vaihdella voimakkaasti, joten mikrobiologisia viljelyitä kannattaa tehdä kohtuullisen usein.

Kartonkikoneen päällystysosalla käytetään niin sanottua taustankostutusvettä, jotta kartonki ei käyristyisi epätasaisen z-suuntaisen kosteusprofiilin takia. Eli kun päällystyspastaa lisätään vain yhdelle puolelle kartonkia, niin vastakkaiselle puolelle lisätään vähän vettä, jotta kosteus pysyisi tasaisena. Tämä kostutusvesi kiertää koneella ns. hullunkiertoa eli palaa sinne yhä uudestaan ja siinä havaittiinkin hieman korkeampia bakteeripitoisuuksia kuin mitä odotettiin sen perusteella että käytetty vesi oli kemiallisesti puhdistettua raakavettä. Kokonaisbakteeripitoisuudet vaihtelivat alle kymmenestä yli tuhanteen pmy/ml:aan (mahdollisesti suurinpiirtein 5000 pmy/ml). Tuota huolestuttavampaa olivat yllättävän korkeat itiöpitoisuudet, jotka vaihtelivat alle kahdestakymmenestä sataan kahdeksaankymmeneen pmy/ml:aan. Saatujen tulosten perusteella taustaveden vaihtuvuutta kannattaisi lisätä tai vaihtoehtoisesti siihen pitäisi alkaa lisätä mikrobintorjunta-ainetta.

7 Puhdasviljelmien eristäminen

Puhdasviljelmiksi eristettiin prosessinäytteissä esiintyviä mikrobeja, säiliön seinämillä kasvavissa limoissa esiintyviä värillisiä ja itiöitä muodostavia mikrobeja sekä

lopputuotteessa esiintyviä mikrobeja. Lopputuotteessa esiintyviä mikrobeja verrattiin prosessinäytteissä ja säiliön seinämällä kasvaneissa limoissa esiintyneisiin pastöroinnin kestäviin mikrobeihin, jotta saataisiin tietää mistä lopputuotteen mikrobit olivat peräisin. Osa tuotteen ja limakerrostumien itiöivistä kannoista sekä limakerrostumien värilliset mikrobikannat laitettiin säilöön nestemäiseen tyypeen jatkotutkimuksia odottamaan.

7.1 Materiaalit ja menetelmät

7.1.1 Syyskuussa otettujen näytteiden analysointi

Prosessinäytteistä, jotka otettiin 30.9.1998 ja lopputuotenäytteistä, jotka otettiin 2.9. ja 30.9.1998, tehdyt kokonaisbakteeri- ja itiöviljelmät tehtiin BetzDearbornin Belgian tutkimuskeskuksessa samalla pintalevitysmenetelmällä kuin on esitetty tämän työ kappaleessa 7.1.2.

Maljoilta valittiin useimmin esiintyvät pesäketyypit, joille tehtiin maljahajotukset. Maljahajotuksessa valittu pesäke poimittiin steriiliin siirrostussilmukkaan, jolla mikrobia levitettiin uudelle PCA-maljalle. Maljoja inkuboitiin 30°C:ssa noin kolmen vuorokauden ajan, minkä jälkeen tehtiin uusia maljahajotuksia kunnes kasvusto vaikutti edustavan ainoastaan yhtä tiettyä kantaa. Puhdistetuille kannoille tehtiin Gram-värjäykset.

Eristettyjä kantoja vertailtiin keskenään ja ne jaoteltiin ryhmiin niiden morfologisten ominaisuuksien ja Gram-värjäystulosten perusteella. Näistä ryhmistä valittiin tiettyjä kantoja, jotka lähetettiin Belgialaiseen Gentin yliopistoon BCCM/LGM Culture Collection Laboratorioihin identifiointiksi.

Yliopistolla kannoille tehtiin Gram-värjäykset ja solujen morfologiaa tutkittiin, lisäksi niille tehtiin oksidaasi- ja katalaasitestit ja niiden glukoosin hajotuskykyä tutkittiin aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa kasvattamalla kantoja Hugh & Leifsonin kasvatusalustassa. Lisäksi solumembraanien rasvahappokoostumukset määritettiin kaasukromatografisesti. Määrittelyssä seurattiin kaupallisen identifointisysteemi MIDIn (Microbial Identification System, Inc., Delaware USA) antamia suositeltavia

työmenetelmiä. Substraattien käyttöä tutkittiin BIOLOG mikrotiitterilevyillä (Biolog Inc., California USA) valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti. Testillä saatiin selville organismin kyky käyttää 95:tä eri hiililähdettä.

7.1.2 Joulukuussa otettujen näytteiden analysointi

Limakerrostumanäytteistä, jotka otettiin 23.12.1998, tehdyistä kokonaisbakteeri- ja itiömaljoista, jotka tehtiin luvussa 7.3., Säiliöiden seinämille kasvaneiden limojen tutkiminen, esitetyllä tavalla tehtiin myös kantojen eristystä puhdasviljelmiksi. Kokonaisbakteeri- ja itiömaljoilta valittiin pesäkkeitä, jotka vaikuttivat olevan vallitsevien kantojen edustajia. Lisäksi kokonaisbakteerimaljoilta eristettiin värillisiä pesäkkeitä muodostavia kantoja.

Valituille pesäkkeille tehtiin maljahajotukset. Maljahajotuksessa valittu pesäke poimitiin steriiliin siirrostussilmukkaan, jolla mikrobia levitettiin uudelle PCA-maljalle. Maljoja inkuboitiin 30°C:ssa noin kolmen vuorokauden ajan, minkä jälkeen tehtiin uusia maljahajotuksia kunnes kasvusto vaikutti edustavan ainoastaan yhtä tiettyä kantaa. Puhdistetuille kannoille tehtiin Gram-värjäykset.

Limakerrostumissa esiintyviä mikrobikantoja haluttiin verrata lopputuotteen mikrobikantoihin, joten myös lopputuotteesta tehtiin maljavalumenetelmällä viljelmät, joista mikrobeja eristettiin edellä esitetyllä tavalla.

Lopputuotteesta leikeltiin aseptisesti 3 g pieniä kartongin palasia hajotuskannuun lisättiin 287 g steriiliä 0,9% NaCl-liuosta ja homogenoitiin Waring 32 BL 80 homogenisaattorilla (Waring Products Division, USA, 1990) 3 minuutin ajan. Kuitusulppua pipetoitiin 1 ml petrimaljalle ja päälle kaadettiin noin 18 ml 45°C:ksi temperoitua PCA-alustaa. Maljoja tehtiin yhteensä 20 kappaletta. Maljoja sekoitettiin pyörittelemällä kunnes sulppu oli sekoittunut tasaisesti agaralustaan, minkä jälkeen maljojen annettiin jähmettyä. Jähmettyneitä maljoja inkuboitiin 45°C:ssa kolmen vuorokauden ajan.

Eristettyjä kantoja vertailtiin keskenään ja ne jaoteltiin ryhmiin niiden pesäkkeiden ja solujen morfologisten ominaisuuksien ja Gram-värjäystulosten perusteella. Näistä

ryhmistä valittiin tiettyjä kantoja, jotka lähetettiin Helsingin yliopistolle identifioidavaksi. Valitut kannat eivät kuitenkaan lähteneet ollenkaan kasvamaan identifiointissa kantojen kasvatukseen käytetyllä alustalla kun kasvatuslämpötilana käytettiin menetelmän vaatimaa 20°C:tta, joten identifiointit jäivät toistaiseksi tekemättä.

7.2 Tulokset

Syyskuussa 1998 identifiointia varten otettujen näytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet on esitetty liitteessä F taulukossa F-1. Maljoilla kasvaneista pesäkkeistä pyrittiin valitsemaan useimmin esiintyneet kannat ja näitä valittuja kantoja puhdistettiin edelleen. Liitteessä F olevassa taulukossa F-2 on esitetty 16 useimmin esiintynyttä kantaa ja näytteet, joissa niitä esiintyi. Liitteessä G on esitetty eristettyjen kantojen morfologiset ominaisuudet ja mahdollisen identifiointin tulokset

Lopputuotenäytteistä eristettiin neljä erityyppistä bakteerikantaa (kannat 1, 5, 15 ja 16). Kolme näistä bakteerikannoista oli itiöiviä aerobisia bakteereita, jotka kestivät kuumennus käsittelyn. Eristetyistä kannoista yksi (kanta 5) identifioidiin *Bacillus*-sukuun kuuluvaksi bakteeriksi, toinen (kanta 15) *Paenibacillus*-sukuun kuuluvaksi bakteeriksi ja kolmas (kanta 16) *Bacillus*-sukuun tai johonkin sitä lähellä olevaan sukuun kuuluvaksi bakteeriksi. Itiöitä muodostamattoman lopputuotteesta eristetyn bakteerikannan (kanta 1) identifioidiin olevan *Sphingomonas capsulata*.

Prosessinäytteistä eristettiin yhteensä kolmesta erityyppistä bakteerikantaa, neljä näistä kannoista esiintyi kolmessa tai useammassa näytteessä. Näistä kannoista saatiin osittain identifioidua kolme, joista yksi oli lopputuotteestakin löytynyt kanta 1 eli *Sphingomonas capsulata*, toinen (kanta 2) oli *Clavibacter michiganense* ja kolmas (kanta 9) oli *Flavobacter cytophaga*-ryhmään kuuluva bakteeri. Kanta 11, joka eristettiin taustankostutusvedestä identifioidiin *Paenibacillus*-sukuun kuuluvaksi bakteeriksi, mutta se ei muistuttanut morfologisilta ominaisuuksiltaan kantaa 15.

7.3 Tulosten tarkastelu

Saatujen tulosten perusteella ei voida päätellä yhtään mitään mahdollisista kontaminaatioreiteistä. Odottamattomin tulos oli itiöimättömän *Sphingomonas capsulata* -bakteerin löytyminen lopputuotteesta, kun yleensä on havaittu että ainoastaan itiöinä olevat bakteerit selviävät koneen kuivatusosasta hengissä läpi. *S. capsulata* -bakteerilla on suojanaan paksu ja vahva limakapseli, mikä ilmeisesti on suojannut bakteereita riittävästi kuumuudelta ja kuivumiselta. Koska tämän bakteerin pesäke on tunnusomaisesti voimakkaan keltainen, sen esiintymistä voitaisiin niin haluttaessa tutkia kohtuullisen helposti laajemmaltikin prosessissa.

8 Säiliöiden seinämille kasvaneiden limojen tutkiminen

8.1 Materiaalit ja menetelmät

Säiliön seinämille kasvaneista limoista otettiin pesuseisakkien aikana näytteet kaapimalla säiliön seinämältä tietyltä noin 10*10cm pinta-alalta kaikki irtoava limakerrostuma taikinakaapimella näytteenottopurkkiin. Kaavittava alue pyrittiin valitsemaan siten, että se vastasi mahdollisimman hyvin koko seinämälle muodostunutta limakerrostumaa. Jos seinämällä oli havaittavissa eri tyyppisiä tai paksuisia limakerrostuma-alueita, kultakin tällaiselta alueelta otettiin näyte.

Otetut näytteet punnittiin ja niistä tehtiin 1% laimennokset, jotka homogenoitiin tehosekoittimella. Laimennukseen käytettiin steriiliä 0,9% NaCl-liuosta. Kokonaisbakteerimääritystä varten homogenoitua laimennettua näytettä ja/tai siitä tehtyä laimennossarjaa siirrostettiin spiraalisiirrostimella PCA-maljoille. Maljoja inkuboitiin 45°C:ssa 3 vuorokautta.

Itiömääritystä varten homogenoitua laimennettua näytettä ja/tai siitä tehtyä laimennossarjaa pastöroitiin pitämällä näytteen sisältävät koeputket 10 minuutin ajan +80°C:ssa vesihauteessa siten, että ajan laskeminen aloitettiin kun referenssiputkessa olevan veden lämpötila oli kohonnut 80°C:een. Limanäytteille, jotka otettiin 10.9.1998, itiöviljelyt tehtiin pintalevitystekniikalla. Pintalevitysmenetelmässä pastöroitua, laimennettua ja homogenoitua näytettä ja/tai sen laimennossarjaa pipetoitiin 1 ml kiinteälle PCA-maljalle, ja liuos levitettiin steriilillä levityskolmiolla maljan pinnalle. Limanäytteille,

jotka otettiin 23.12.1998, itiömääritys tehtiin maljavalumenetelmällä. Pastöroitua laimennettua näytettä ja/tai siitä tehtyä laimennossarjaa pipetoitiin 1 ml petrimaljalle ja päälle kaadettiin noin 18 ml 45°C:ksi temperoitua PCA-alustaa. Maljaa heiluteltiin kunnes näyte oli sekoittunut alustaan, minkä jälkeen alustan annettiin jähmettyä. Jähmetettyjä PCA-maljoja inkuboitiin 2 vuorokauden ajan +45°C:ssa.

Muodostuneiden pesäkkeiden määrä laskettiin maljoilta ja näytteiden sisältämät mikrobimäärät pmy/g saatiin selville kaavan (3) mukaisesti:

$$C_m = N_p / \Sigma(V_{l,i} * L_{m,i}) \quad (3)$$

Missä C_m = itiöpitoisuus, pmy/g

N_p = laskettujen pesäkkeiden lukumäärä (pmy) ja

$V_{l,i}$ = maljalle pipetoidun laimennoksen tilavuus (ml) ja

$L_{m,i}$ = laimennoskerroin (g näytettä/ml liuosta).

Itiöpitoisuus neliösenttimetriä kohti laskettiin kaavaa (4) käyttäen:

$$C_A = C_m * m_{on} / A_n, \quad (4)$$

Missä C_A = itiöpitoisuus, pmy/cm²,

C_m = itiöpitoisuus, pmy/g,

m_n = otetun näytteen massa (g) ja

A_n = pinta-ala (cm²), jolta näyte otettiin.

Mikäli säiliössä esiintyi useampaa erityyppistä limakerrostumaa, säiliössä esiintyvä keskimääräinen itiöpitoisuus saatiin laskemalla eri limakerroksien sisältämien itiöpitoisuuksien painotettu keskiarvo. Painokertoimina käytettiin limakerrostumien peittämien alueiden visuaalisesti arvioituja osuuksia säiliön kokonaispinta-alasta.

8.2 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Taulukossa 5 on esitetty arvioidut kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet pinta-alayksikköä kohti säiliöiden seinämällä. Kokonaisbakteeripitoisuudet ovat siis 85:stä 25 000 000:aan pesäkettä muodostavaa yksikköä neliösentillä ja itiöpitoisuudet 68:sta 650000:een pmy/cm². Kun nämä mikrobipitoisuudet kerrotaan arvioiduilla kartonkikoneelta löytyviltä vesisäiliöiden ja viirakaivojen yhteenlasketuilla pinta-aloilla niin saadaan arviot siitä, suurinpiirtein kuinka paljon mikrobeja koneella esiintyvissä limasaostumissa voisi

olla bakteereita ja itiöitä. Jos putkistojen pinnat otettaisiin huomioon niin se todennäköisesti suurinpiirtein kaksinkertaistaisi pinta- alan ja siten myös mikrobimäärät.

Säiliöiden seinämillä on saatujen tulosten mukaan suurinpiirtein $1 \cdot 10^{14}$ pmy (eli 100 000 000 000 000) bakteereita ja noin $2 \cdot 10^{12}$ (eli 1 000 000 000 000) pmy itiöitä. Määrät näyttävät varsin suurille, mutta kun niitä vertaa esimerkiksi kiertovesitornin keskimääräiseen termofiilisten bakteereiden määrään $1,65 \cdot 10^7$ pmy/ml eli $1 \cdot 10^{16}$ pmy/800m³ ja termofiilisten itiöiden määrään 200 pmy/ml eli $2 \cdot 10^{11}$ pmy/800m³ , niin määrät asettuvat paremmin oikeaan kokoluokkaansa. Prosessin vesisäiliöiden pinnoilla näyttäisi siis olevan saman verran termofiilisiä bakteereita kuin kahdeksassa kuutiometrissä kiertovesitornin vettä ja itiöitä on saman verran kuin kahdeksassakymmenessä kuutiometrissä kiertovesitornin vettä. Mikrobipitoisuudet limakerrostumissa ovat merkittäviä, ja limoissa esiintyvät bakteerit toimivat todennäköisesti hyvinä ymppeinä, mutta ne eivät kuitenkaan yksinään kaada tai pelasta koko koneen mikrobiologista systeemiä. Itiöiden runsas esiintyminen aiheuttaa sen, että riittämättömien pesujen ja pesujen jälkeisten huuhteluiden jälkeen, eli silloin kun limasaostumaa jää säiliöiden ja putkien pinnoille tai irronnutta limaa jää samaisiin paikkoihin, mikrobiologinen toiminta voi alkaa hyvinkin nopeasti ja tehokkaasti, koska pesukemikaalit eivät tuhoa itiöitä. Limamatriisi suojaa kohtalaisen hyvin myös vegetatiivisia mikrobisoluja, eli ainakin saostumien sisäosissa olevat solut kestävät huomattavan hyvin pesukemikaaleja ja mikrobintorjunta-aineita.

Taulukko 5 Limasaostumien kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet

Säiliö	Kokonaisbakteeripitoisuus pmy/cm ²	Itiöpitoisuus pmy/cm ²
Kirkassuodossäiliö	4,0E6	5,1E3
Sameasuodossäiliö	1,0E7	2,1E5
Suihkuvesisäiliö	2,5E7	6,5E5
Kiertovesisäiliö 1	8,5E1	6,8E1
Kiertovesisäiliö 2	8,2E5	7,1E3
Viirakaivo 2	1,9E6	9,7E4
Viirakaivo 3	9,1E4	9,8E3

9 Tehoainetestin teko limanäytteelle

Tehoainetestauksen tarkoituksena on määrittää mitkä biosidit olivat tehokkaimpia näytteessä esiintyvien mikrobien käsittelyssä. Jotta tulos vastaisi mahdollisimman hyvin prosessissa tapahtuvaa biosidikäsittelyä, kasvatusolosuhteiden tulee vastata mahdollisimman hyvin prosessiolosuhteita. Biosideja lisätään kuitenkin prosessissa käytettäviä biosidipitoisuuksia enemmän, jotta tehoaineiden välille saataisiin selkeitä eroja, jotka eivät peity tilastolliseen epätarkkuuteen.

Biosidejä lisättäessä tulee ottaa huomioon niiden kemialliset ominaisuudet. Koska monien tehoaineiden puoliintumisaika on riippuvainen pH:sta, on tarvittaessa biosidin esilaimennuksessa käytettävä puskuroitua liuosta. Lisäksi tietyt tehoaineet hajoavat valon vaikutuksesta, joten biosidilisäyksen jälkeinen inkubointi tulee tarvittaessa suorittaa pimeässä.

9.1 Materiaalit ja menetelmät

Tehoainetestaukseen valittiin seuraavat biosidit: Daracide 856 (2,1% 5-kloori-2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-onin ja 2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-onin seos), Daracide 7815/25%, (25% glutaraldehydi), Daracide 7815/50% (50% glutaraldehydi), Daracide 7848 (7,5% glutaraldehydiä ja 1,9% 5-kloori-2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-onin ja 2-metyyli-4-isotiatsoliini-3-onin seosta), Daracide 7849 (10% metyleenibistiosyanaatti), SlimeTrol RX-136 (20% 2,2-dibromi-2-syanoasetamidi) ja 50% vetyperoksidi. Biosidipitoisuudeksi valittiin 200 ppm ja inkubointilämpötilaksi 45°C.

Kiekkosuotimelta otettua punertavaa limanäytettä homogenoitiin ensin etanolilla puhdistetulla sauvasekoittimella sekoittaen. Saostumanäytettä otettiin 100 g ja lisättiin 900 g steriiliä 0,9% NaCl-liuosta, minkä jälkeen seos homogenoitiin tehosekoittimella. Homogeenista seosta punnittiin 200 g erlenmayerpulloihin ja pullojen annettiin temperoitua 45°C:ssa ravistelukaapissa.

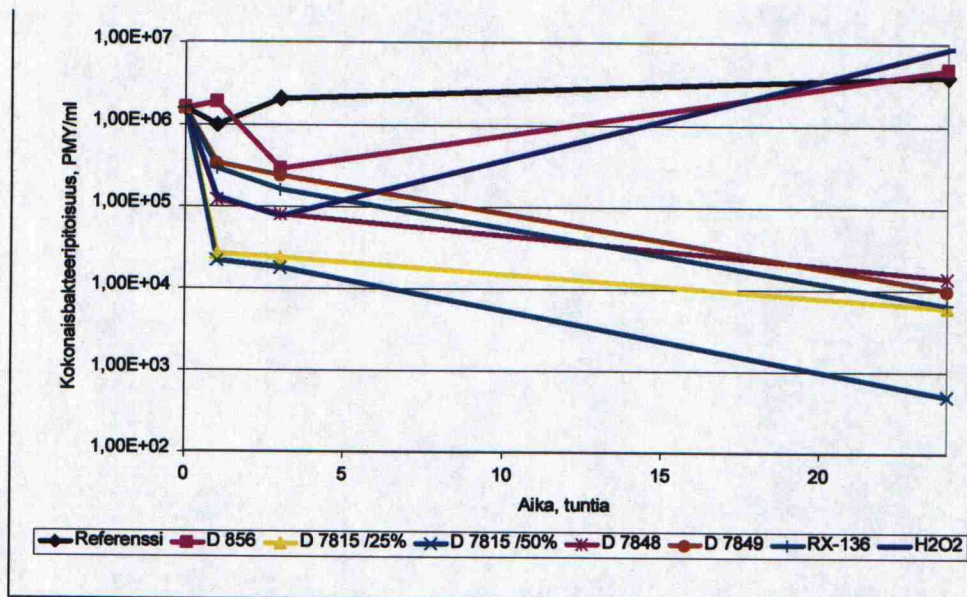
Limantorjunta-aineita pipetoitiin 40 µl erlenmayerpulloissa olevien limanäytteiden sekaan ja pulloja ravistettiin, jotta biosidit sekoittuisivat tehokkaasti laimennettuun limanäytteeseen. Referenssipullosta otettiin näyte, josta tehtiin kokonaisbakteeri- ja itiömääritykset. Kaikki erlenmayerpullot pantiin 45°C:een ravistelukaappiin ja ravistelu

kytkettiin päälle. Tunnin, kolmen tunnin ja vuorokauden kuluttua biosidilisäyksestä pulloista otettiin näytteet, joista tehtiin kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuusmääritykset.

Kokonaisbakteeri- ja itiömäärityksissä homogenoitua näytettä ja/tai sen 0,9% NaCl-liuokseen tehtyä laimennossarjaa siirrostettiin spiraalisiirrostimella MERCKin PCA-maljoille. Itiömäärityksiin käytetyt näytteet pastöroitiin ennen siirrostusta pitämällä näytteen sisältävät koeputket +80°C:ssa vesihauteessa 10 minuutin ajan. Maljoja inkuboitui 45°C:ssa 2 vuorokautta. Muodostuneiden pesäkkeiden määrät laskettiin ja saadut pitoisuudet korjattiin vastaamaan näytteen mikrobipitoisuutta jakamalla saatu tulos käytetyllä laimennuskertoimella. Eli jos maljalle oli siirrostettu 10^{-3} -laimennosta, laskettu pitoisuus jaettiin 10^3 :lla, jolloin tulokseksi saatiin näytteen sisältämä mikrobipitoisuus. Alkulaimennosta (10^{-1}) ei otettu tuloksissa huomioon.

9.2 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tehoainetestauksessa saadut tulokset on esitetty kuvissa 35 ja 36 sekä taulukoidussa muodossa liitteessä H, tehoainetestin tulokset, lisäksi taulukossa 6 on esitetty käsiteltyjen näytteiden kokonaisbakteeripitoisuudet suhteutettuna referenssinäytteen kokonaisbakteeripitoisuuteen.



Kuva 35. Tehoainetestauksessa määritetyt kokonaisbakteeripitoisuudet. Käytetyt biosidit olivat Daracide 856, Daracide 7815 (25%), Daracide 7815 (50%), Daracide 7848, Daracide 7849, Slimetrol RX-136 ja 50% vetyperoksidi.

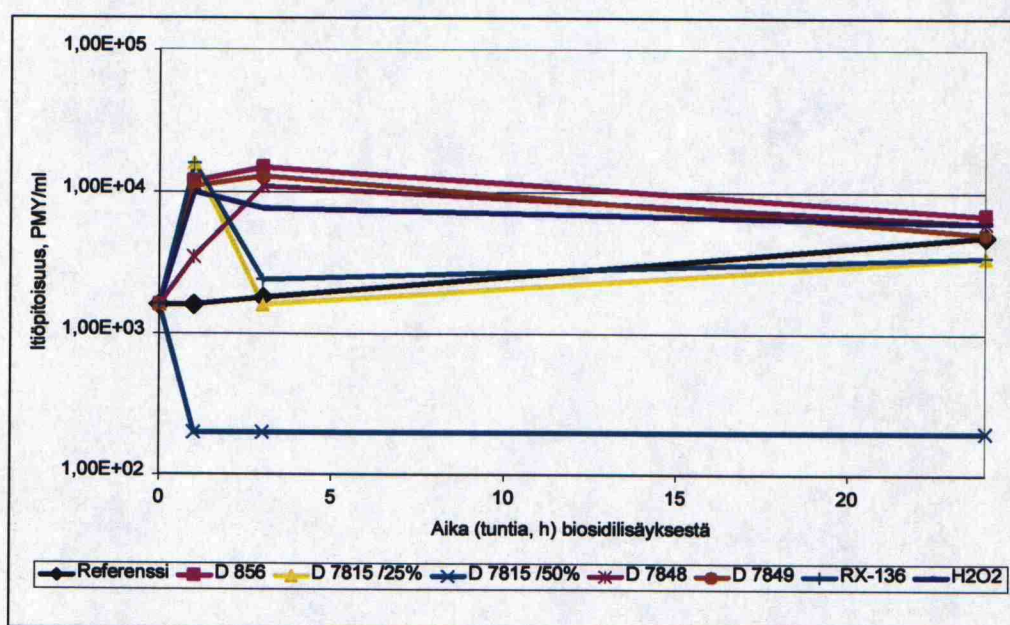
Tehoainetestissä kaikista tehokkaimmin tutkitussa näytteissä esiintyneitä bakteereita vastaan näytti toimivan Daracide 7815 (50%), joka oli laskenut kokonaisbakteeripitoisuutta miltei kahdella dekadilla jo yhden tunnin kuluttua biosidilisäyksestä ja joka laski kokonaisbakteeripitoisuutta sen jälkeenkin siten, että vuorokauden kuluttua biosidilisäyksestä kokonaisbakteeripitoisuus oli laskenut kolmella ja puolella dekadilla lähtötilanteesta ja käsitellyssä näytteessä oli 99,99%:a vähemmän pesäkkeitä muodostavia bakteereita kuin referenssinäytteessä. Daracide 856:tta ja vetyperoksidia lukuunottamatta kaikki muutkin biosidit alensivat kokonaisbakteeripitoisuutta varsin nopeasti ja vaikutus kasvoi ainakin 1 vuorokauden tulokseen asti. Tehokkaimmilla vällinneita bakteerikantoja vastaan näyttivät kuitenkin olleen glutaraldehydiä sisältäneet tuotteet (Daracide 7815 (50%) ja (25%) ja Daracide 7848).

Daracide 856 ei ehtinyt vaikuttaa kokonaisbakteeripitoisuuteen vielä yhden tunnin kuluttua, silti sen vaikutus näkyi kuitenkin 3 tunnin kuluttua biosidilisäyksestä, mutta vuorokauden kuluttua kokonaisbakteeripitoisuus oli ehtinyt karata takaisin referenssinäytteen tasolle.

Vetyperoksidi puolestaan oli tuhonnut bakteereita jo yhden tunnin kuluttua lisäyksestään, mutta vuorokauden kohdalla vetyperoksidi näytti suorastaan tehostaneen näytteessä esiintyneiden bakteereiden kasvua. Syy tähän saattaisi olla se, että tuhoessaan mikrobisoluja vetyperoksidi on vapauttanut solumateriaaleja ja solujen sisällä olleita ravinteita muiden mikrobien käyttöön, ja muista käytetyistä mikrobintorjunta-aineista poiketen vetyperoksidilla ei ole antimikrobiaalisia vaikutuksia sen hapetustehon kuluttua jo muutamien minuuttien kontaktiajan jälkeen.

Taulukko 6. Tehoainetestin kokonaisbakteeripitoisuudet suhteutettuna referenssinäytteen kokonaisbakteeripitoisuuteen.

Biosidi / Aikaa kulunut biosidi lisäyksestä (h)	1	3	24
Referenssi	100 %	100 %	100 %
Daracide 7815 (50% glut.)	2,2 %	0,9 %	0,0 %
Daracide 7815 (25% glut.)	2,7 %	1,1 %	0,2 %
Daracide 7848 (7,5% glut. + 1,9% ISO)	12 %	3,8 %	0,4 %
D 856 (1,2% ISO)	190 %	14 %	123 %
Daracide 7849 (10% MBTC)	34 %	11 %	0,3 %
Slimetrol RX-136 (20% DBNPA)	29 %	7,6 %	0,2 %
Vetyperoksidi, 50%	13 %	3,6 %	218 %



Kuva 36. Tehoainetestauksessa määritetyt itiöpitoisuudet. Biosidit olivat Daracide 856, Daracide 7815 (25%), Daracide 7815 (50%), Daracide 7848, Daracide 7849, Slimetrol RX-136 ja 50% vetyperoksidi.

Biosidien vaikutukset näytteen itiöpitoisuuteen olivat hieman sekavampia. Ainoastaan Daracide 7815 (50%) alensi itiöpitoisuutta lähtötilanteeseen ja referenssinäytteeseen nähden. Kaikki muut mikrobintorjunta-aineet näyttivät ainakin hetkellisesti nostavan itiöpitoisuutta. Osittain saatua tulosta voi selittää myös käytetyn menetelmän epätarkkuus, mutta tulosten perusteella vaikuttaisi kuitenkin sille, että osa biosideista saattaa indusoida bakteerien itiöitymistä.

Tämän testin perusteella näyttäisi, että limasaostumissa esiintyviä bakteereita torjuttaessa tehokkaimpia näyttäisivät olevan glutaraldehydiä sisältävät tuotteet. Näitä tuloksia tarkasteltaessa tulee muistaa, että kyseessä on laboratoriossa tehty hyvin pieni-muotoinen koe, jossa olosuhteet vastaavat todellisia prosessiolosuhteita vain suurinpiirtein. Se, että testataan torjunta-aineiden vaikutusta erittäin hyvin sekoitettuun ja hyvin ilmastettuun 200 ml:n näytteeseen, eroaa huomattavasti prosessissa vallitsevista todellisista olosuhteista, missä sekoitus on kaukana ideaalisesta, ilmastus on suhteellisen vähäistä, virtausmäärät ovat monia kuutiometrejä minuutissa ja limasaostuman mikrobit ovat kerrostuneina metallipinnalle tarttuneessa limasaostumassa.

10 Biofilmin muodostuksen seuraaminen Robbins-putken avulla

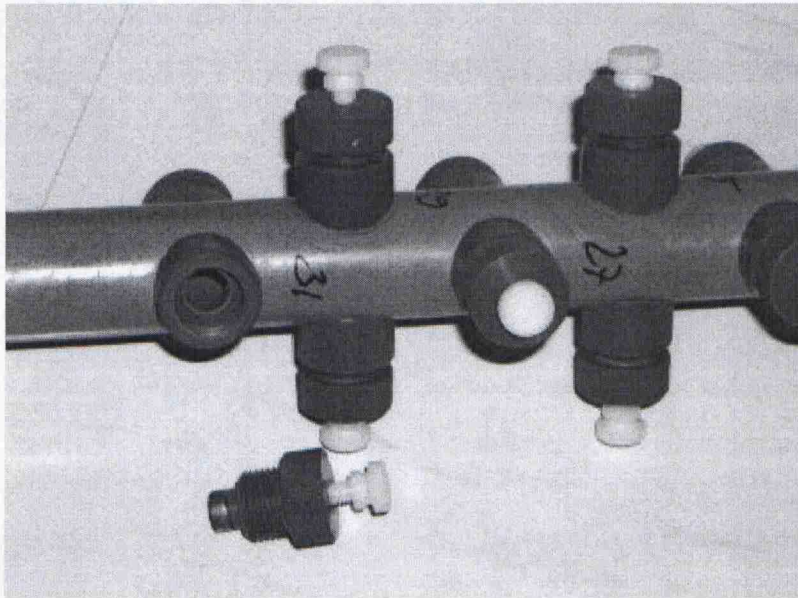
10.1 Materiaalit ja menetelmät

Biofilmin muodostusnopeutta ja Spectrum NT2001 biofilmi inhibiittorin vaikutusta biofilmin muodostumiseen tutkittiin liittämällä ns. Robbins-laite kirkassuodos säiliöstä lähtevän putken pumpun imupuolelta erkanevaan sivuvirtaan. Virtaus Robbins-putkessa oli noin 0,1 m/s. Spectrum NT2001-koeajoissa biofilmi inhibiittoria syötettiin jatkuvasti kirkassuodossäiliöön säiliön kansiluukun kautta vedetyn annosteluletkun avulla. Annostelupitoisuuksiksi valittiin noin 6 ja 15 ppm.

Käytetty Robbins-laite koostui prosessin sivuvirtaan liitettävästä muoviputkesta, johon oli istutettuna 32 ruostumattomasta teräksestä valmistettua koepalaa, jotka voitiin irrottaa ja vaihtaa. Kuvassa 37 on esitetty Robbins-putken rakenne. Koepalat olivat muodoltaan toisesta päästään levennettyjä sylintereitä, ainoastaan leveämmän pään pinta tuli laitteen käytössä ollessa kosketukseen virtaavan nesteen kanssa.

Koeajaksojen pituudeksi valittiin kolme vuorokautta. Koepaloja otettiin Robbins-putkesta 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua laitteen liittämisestä prosessiin. Kullakin kerralla koepaloja vaihdettiin neljä tai viisi kappaletta. Mikrobin tarttumista ja biofilmin muodostusta seurattiin DEFT-menetelmällä. Koepalojen pinnalle tarttuneet mikrobit värjätettiin akridiinioranssilla. Koepalat huuhdeltiin heti niiden irrotuksen jälkeen vedellä, jotta koepalaan jäisi kiinni vain siihen kunnolla kiinnittynyt aines, ja koepalojen annettiin

kuivua. Värjäys tapahtui pipetoimalla akridiinioranssi-reagenssia (Becton Dickinson 4312536, Acridine Orange; 0,1g akridiinioranssia 1000ml:ssa 0,5M asetattipuskuriliuosta) koepalan pinnalle ja antamalla reagenssin vaikuttaa 2 minuutin ajan, minkä jälkeen reagenssi huuhdeltiin vesijohtovedellä pois. Koepalojen annettiin uudelleen kuivahtaa, minkä jälkeen niitä voitiin alkaa mikroskopoida.



Kuva 37. Työssä käytetty Robbins-putki.

Käytetty mikroskooppi oli Zeiss Axioplan tutkimusmikroskooppi (Zeiss, Saksa, 1991), johon oli liitetty Panasonic CCD WV-CC 700/G videokamera (Matsushita Electric, Japani, 1993) joka oli edelleen liitetty kiinni tietokoneeseen. Mikroskopoitaessa koepaloista otettiin kuvia talteen tietokoneelle ja otettuja kuvia analysoitiin myöhemmin tarkemmin.

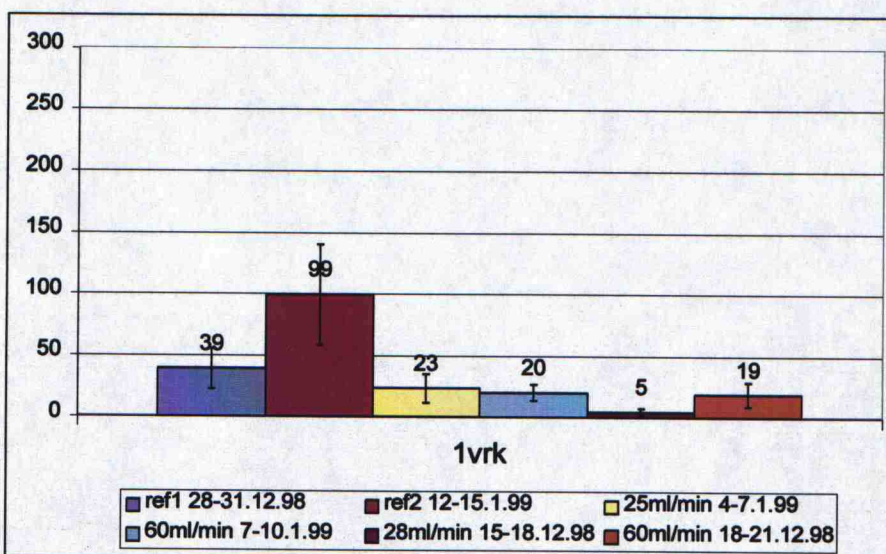
Jotta koepalan pinnalle tarttuneen materiaalin määrästä saatiin hyvä yleiskuva, kustakin koepalasta otettiin ensin kaksi kuvaa pienehköllä suurennuksella (objektiivin suurennos kymmenkertainen), minkä jälkeen koepalasta otettiin suuremmalla suurennoksella (objektiivin suurennos 63-kertainen), kolme (5 koepalaa/näytteenotto) tai neljä (4 koepalaa/näytteenotto) kuvaa. Kuvien ottokohdat valittiin siten, että kohta oli kohtuullisen kaukana koepalan reunasta, muttei kuitenkaan aivan keskellä koepalaa ja kuvan alueella ei ollut huomattavan suuria naarmuja metallipinnassa.

Kuvattavia kohtia ei kuitenkaan valittu tarkasti, jottei valinta päässyt vaikuttamaan saatuihin tuloksiin. Niistä kuvista, joissa objektiivin suurennoksena oli 63-kertainen suurennos, laskettiin kuvissa näkyvien solujen lukumäärä ja laskettiin keskiarvo yhdessä kuvassa esiintyvien mikrobisolujen lukumäärälle. Mikrobisolut näkyivät kuvissa punaisina, oransseina ja vihertävinä ja ne olivat tunnusomaisen muotoisia. Kuvassa 41 on muutamia esimerkkejä siitä, mille mikroskopointikuvat näyttivät. Mikäli oli epäselvää oliko kuvassa näkyvä objekti solu vai ei, sen laskettiin olevan solu. Muutamissa kuvissa solujen määrä oli erittäin suuri, tällöin solut laskettiin vain osasta kuvaa, esim. 1/16 osasta ja korjattiin saatu luku kertomalla se tässä tapauksessa kuudellatoista.

10.2 Tulokset ja tulosten tarkastelu

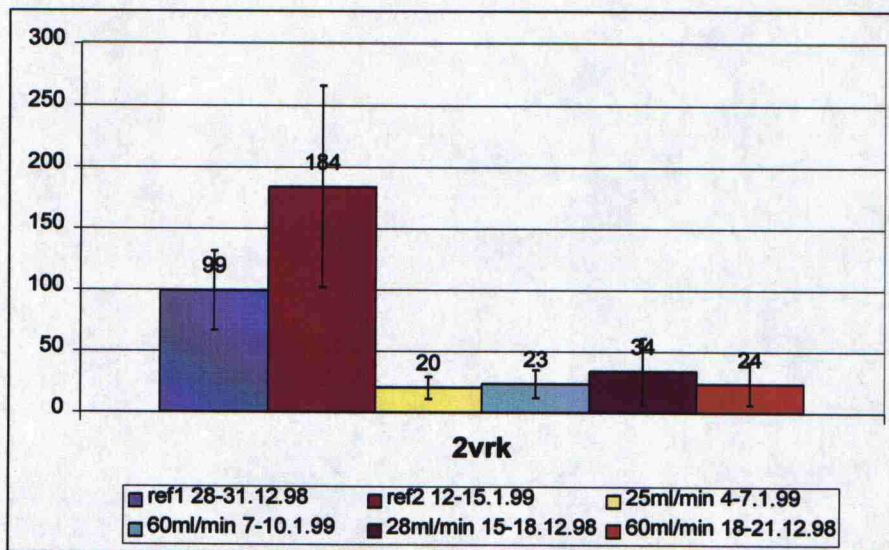
Kuvissa 38, 39 ja 40 on esitetty keskiarvot kuvissa esiintyneiden solujen määristä. Tuloksen ovat lähinnä suuntaa antavia, mutta solumäärissä on kuitenkin havaittavissa tasoeroja referenssi- ja koeajojaksojen välillä. Kuviin on merkitty myös virherajat 90%-luotettavuustasolla.

Kuvassa 38 on esitetty solujen määrät yhden vuorokauden kuluttua koepalojen prosessiin laittamisesta. Solumäärät ovat olleet kaikilla jaksoilla varsin alhaisia, satunnaisia soluja siellä täällä ja vain muutamia pienehköjä soluryppäitä.



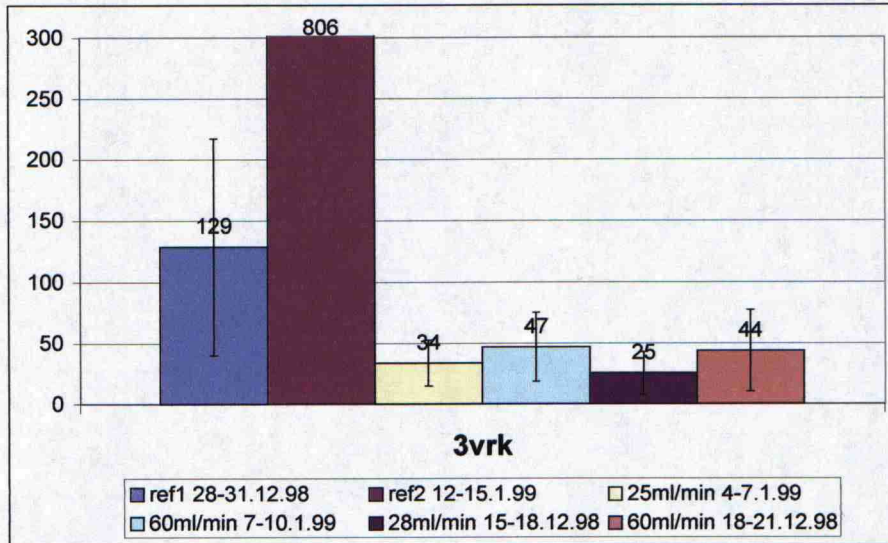
Kuva 38. Robbinsputkessa yhden vuorokauden olleiden koepalojen mikroskopointitulokset. Tulokset ovat keskiarvoja yhdessä mikroskooppikuvassa näkyneiden solujen määristä. Virherajat on laskettu 90%:n luotettavuustasolla.

Kahden vuorokauden ajan prosessin sivuvirrassa olleiden koepalojen limoittumisessa alkaa näkyä jo kohtuullisen selviä eroja. Jaksoilla, jolloin prosessiin ei syötetty biofilmi-inhibiittoria mikrobeja tarttui huomattavasti enemmän metallisiin koepaloihin ja mikroskopoitaessa niissä oli selkeästi havaittavissa jo soluryppäitä. Biofilmi-inhibiittorin lisäys jaksoilla koepalojen pintoihin oli tarttunut vain satunnaisia soluja, ja muutamat havaitut soluryppäät olivat varsin pieniä.

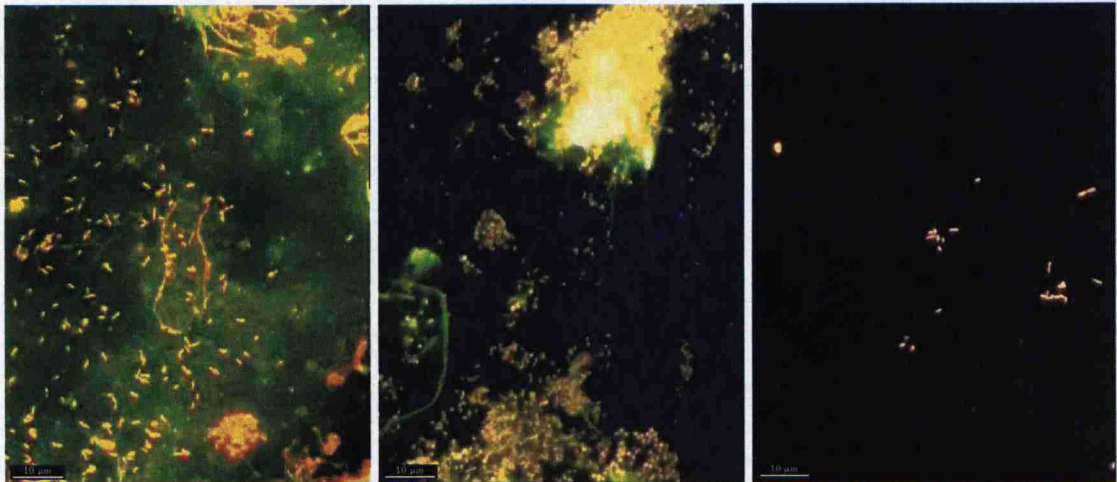


Kuva 39. Robbinsputkessa kaksi vuorokautta olleiden koepalojen mikroskopointitulokset. Tulokset ovat keskiarvoja yhdessä mikroskooppikuvassa näkyneiden solujen määristä. Virherajat on laskettu 90%:n luotettavuustasolla.

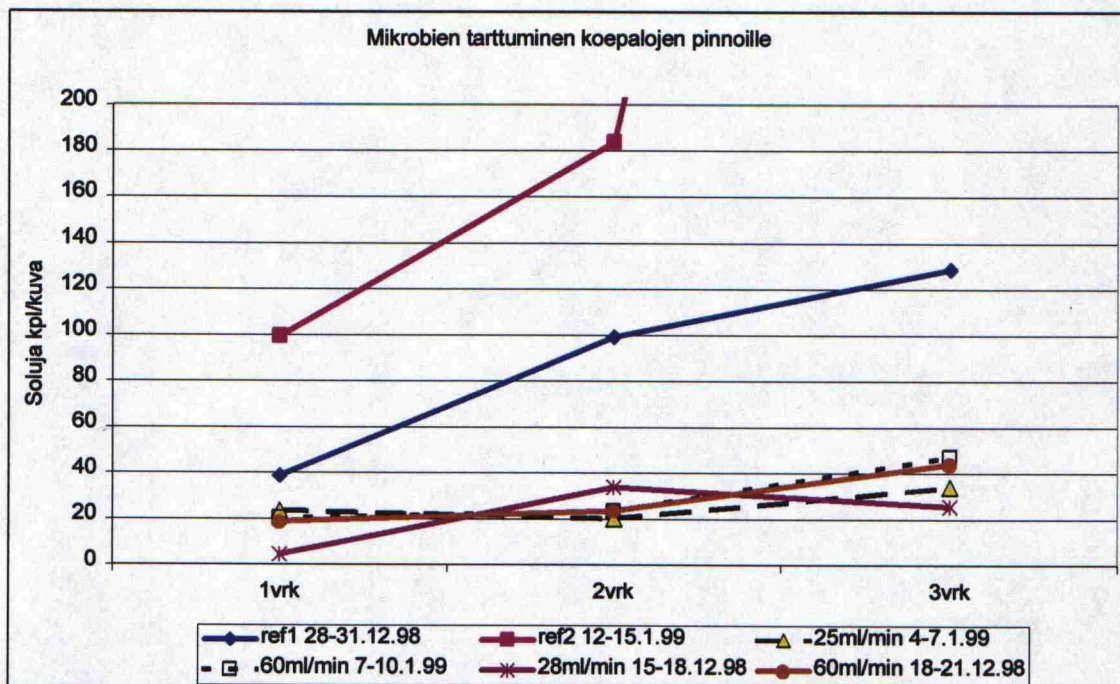
Kolmen vuorokauden ajan prosessin sivuvirrassa olleiden koepalojen limoittumisessa referenssi- ja koeajojaksojen väliset erot olivat entisestään kasvaneet. Referenssijaksojen koepaloissa oli havaittavissa jo suurehkoja alueita, jotka olivat kasvaneet täyteen mikrobilimaa. Lisäksi nämä kasvustot olivat jo alkaneet kasvaa paksuutta. Siellä täällä oli havaittavissa alueita, jotka näyttivät sille, että niistä olisi irronnut limakerros pois. Joulukuussa ja tammikussa ajettujen referenssijaksojen koepaloja mikroskopoidessa oli havaittavissa, että mikrobipopulaatiossa oli tapahtunut muutoksia. Joulukuussa pääosa metallipinnalle tarttuneista mikrobeista oli sauvamuotoisia, mutta tammikuun referenssijaksolla esiintyi enemmän hieman pienikokoisempia kokkimuotoisia bakteereita. Biofilmi-inhibiittorikoeajojaksojen koepaloissa solut esiintyivät pääasiassa yksittäin tai hyvin pieninä ryppäinä. Referenssi- ja koeajojaksoilla kolme vuorokautta prosessissa olleista koepaloista otetuista kuvista mahdollisimman edustavat kuvat on esitetty kuvassa 41.



Kuva 40. Robbinsputkessa kolme vuorokautta olleiden koepalojen mikroskopointituloksia, Tulokset ovat keskiarvoja yhdessä mikroskooppikuvassa näkyneiden solujen määrästä. Virherajat on laskettu 90%:n luotettavuustasolla.



Kuva 41. Vasemmalla edustava koepalasta otettu kuva joulukuun referenssijaksolta, keskimmäisenä tammikuun referenssijaksolta ja oikealla tammikuun biofilmi-inhibiittori koeajajaksolta (annostelu 25ml/min). Kuvien vasemmassa alakulmassa olevan palkin pituus on kymmenen mikrometriä.



Kuva 42. Robbinsputkessa olleiden koepalojen mikroskopointituloksia, Tulokset ovat keskiarvoja yhdessä mikroskooppikuvassa näkyneiden solujen määristä.

Kuvassa 42 on esitetty kaikkien koeajo- ja referenssijaksojen tulokset 1,2 ja 3 vuorokauden kohdilta. Saadut tulokset ovat ainoastaan suuntaa-antavia, mutta niistä voitaneen kuitenkin päätellä, että limoittuminen alkoi merkittävästi hitaammin kun prosessiin lisättiin biofilmi-inhibiittoria. Eri annostelumäärien (25-60ml/min) välillä ei voitu havaita eroja, ilmeisesti biofilmin muodostuksen hallintaan riittäisi alle 25 ml/min annostelutaso.

Tässä esitetty menetelmä näytti soveltuvan kohtuullisen hyvin biofilmin muodostuksen alkuvaiheen seurantaan. Jotta tällä menetelmällä saadaan luotettavia tuloksia tulee varmistua, ettei prosessista koepalaputkeen tuleva letku pääse limoittumaan, mikä aiheuttaisi huomattavia vääristymiä saataviin tuloksiin. Menetelmä voisi olla mahdollista automatisoida, joko kuva-analytiikan tai jonkinlaisen automaattisen fluoresenssia mittavan laitteen avulla. Analysointia automatisoitaessa tulisi todennäköisesti kuitenkin valita jokin muu fluoresoiva väriaine kuin akridiinioranssi, koska akridiinioranssi näyttää adsorboituvan myös muiden paperiprosessissa esiintyvien aineiden kuin mikrobien DNA:n ja RNA:n kanssa.

Etsittäessä prosessiin tehokkainta mahdollista limantorjuntasysteemiä mikrobisidien alustava valinta kannattaisi tehdä kappaleessa 10 esitetyn kaltaisella testausmenetelmällä ja sitten varmistaa saatu tulos koepaloja analysoimalla. Tällainen testausmenetelmä kertoisi kohtuullisen nopeasti, miten biofilmin muodostumisnopeus muuttuu. Menetelmä ei kuitenkaan kertoisi miten biofilmin kasvu jatkuu alkuvaiheen jälkeen ja miten se etenee prosessissa alueilla, joissa virtausolosuhteet ovat huomattavan erilaiset kuin koepalasysteemissä. Lopullinen selvyys mikrobintorjuntakäsittelyn toimivuudesta tai toimimattomuudesta saadaan vasta pitemmän ajan kuluttua seurattaessa prosessin ajettavuuden kannalta kriittisten pisteiden limoittumista, mutta tällaisella koejärjestelyllä saataisiin kuitenkin mitattavissa olevia tuloksia nähtäväksi kohtuullisen nopeasti.

11 Tulosten yhteenveto ja johtopäätökset

Tässä työssä tehtyjen prosessinäytteiden ja lopputuotenäytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuus määritystuloksista havaittiin selkeästi se, että prosessissa kaikki riippuu kaikesta ja yhdistävänä tekijänä on erityisesti kiertovesisysteemi. Pääraaka-aineena paperin valmistusprosessissa on mikrobiologiselta kannalta katsottuna prosessissa kierrätettävä vesi.

Kiertovesijärjestelmä aiheuttaa kontaminaatioiden leviämisen niin nopeasti ja laajasti ympäri koko prosessia, että selkeitä kontaminaatiolähteitä on vaikea erottaa käytössä olevilla menetelmillä. Kiertovesisäiliöt ja –torni ovat eräänlainen prosessin solmukohta, johon eri raaka-aineiden mukana tulleet uudet mikrobikontaminaatiot päätyvät ja jonka kautta eri säiliöissä lisääntymään päässeet mikrobit leviävät muihinkin prosessijakeisiin. Prosessissa kiertovesijärjestelmä vaikutti toimivan kontaminaation levittäjänä ja hylkysysteemi näytti toimivan yhtenä erityisen tehokkaana mikrobien kasvatuspaikkana.

Tässä työssä saaduista tuloksista ei löydetty selkeitä yksittäisiä tekijöitä, jotka olisivat määränneet lopputuotteen mikrobipitoisuuden. Selkein korrelaatio lopputuotteen mikrobipitoisuuden kanssa oli kiertoveden mesofiilisella kokonaisbakteeripitoisuudella. Hylkysysteemin vaikutus lopputuotteen bakteerimääriin oli odotettua pienempi. Usein

hylkymassaa pidetään pääasiallisen itiölähteenä, erityisesti koska hylkykartongissa, joka on kulkenut kuivatusosan läpi on mukana ainoastaan itiöiviä bakteereita. Ilmeisesti hylkykartongin mikrobipitoisuus kuitenkin peittyy hylyn pulpperoinnissa laimennusvetenä käytettävän kiertoveden korkeamman mikrobipitoisuuden alle. Hylkymassan mikrobipitoisuudet saattavat kuitenkin olla satunnaisten poikkeuksellisen korkeiden lopputuotteen itiöpitoisuuksien aiheuttajia.

Vaikuttaa todennäköiselle, että normaalitilanteessa lopputuotteen kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet ovat suhteellisen alhaisia ja itiöitä ei tule varsinaisesti mistään tietystä jakeesta vaan itiöitä esiintyy pienehköjä määriä jokapuolella prosessia. Poikkeustapauksissa lopputuotteen kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuus kohoaa äkillisesti normaalia korkeammaksi, ja tällöin nämä mikrobit ovat peräisin jostain tietystä erityisen kontaminoituneesta lähteestä. Tuollainen kontaminaatiolähde voi olla esimerkiksi erityisen mikrobipitoinen rullahylky, pitkän aikaa seissyt hylkypulpperi tai massasäiliö tai jokin lisäaine kuten päällystyspasta, jonka säilöntä on ollut puutteellinen.

Mikrobipopulaatio paperikoneella vaikutti olevan hyvin monipuolinen ja –muotoinen. Teoriassa mikrobien identifioinnin perusteella tehtävä kontaminaatiolähteiden selvittäminen kuulostaa hyvin toimivalle ajatukselle, mutta käytännössä on tarpeettoman työlästä lähteä eristämään ja puhdistamaan niin suurta valikoimaa bakteereita eripuolilta prosessia, että kontaminaatiolähteisiin päästäisiin luotettavasti kiinni. Suurena ongelmana paperikoneilla esiintyvien mikrobien identifioinnissa on edelleenkin se, että useimmat identifiointimenetelmät ja erityisesti miltei kaikki identifioinnissa käytettävät tietokannat ja kirjastot on kehitetty lähinnä kliinisten mikrobikantojen tunnistamista varten. Paperikoneilta eristetyt mikrobikannat eroavat yleensä varsin paljon samanlaisista kliinisistä kannoista. Kuten tässäkin työssä havaittiin niin identifionti jäi tekemättä, koska paperikoneelta eristetyt bakteerikannat eivät suostuneet kasvamaan kliinisiä kantoja varten suunnitellun identifiointimenetelmän vaatimalla kasvatusalustalla ja vaaditussa lämpötilassa.

Suuri ongelma paperikoneen mikrobiologiaa tutkittaessa on se, etteivät läheskään kaikki mikrobit suostu kasvamaan käytetyillä kasvatusalustoilla, joten voi olla että hyvinkin suuret vaihtelut mikrobipopulaatioiden koossa jäävät havaitsematta. Toinen suuri ongelma on, että itiöiviä bakteereita määritettäessä, määritettiin nyt bakteeri-itiöiden

pitoisuus eikä itiöitymään pystyvien bakteereiden pitoisuus. Tuossa on erittäin merkittävä ero. Lopputuotteen itiöpitoisuuden hallinnan kannalta olisi hyödyllistä kehittää entistä toimivampia keinoja määrittää, seurata ja testata itiöivien bakteerien esiintymistä prosessissa. Voisi olla informatiivista tehdä tehoainetesti myös näytteelle, josta on lämpökäsittelyllä tapettu kaikki vegetatiiviset mikrobisolut ja jäljellä ovat ainoastaan itiöivät bakteerit.

Lopputuotteen mikrobipitoisuuden pitämiseksi alhaisena, tulee huolehtia siitä, ettei itiöiviä bakteereita esiinny vegetatiivisessa muodossaan liikaa ja etteivät ne pääse lisääntymään liikaa ja sitten itiöidy. Vegetatiivimuodossaan olevia itiöiviä bakteereita ei kuitenkaan pystytä määrittämään helposti nyt käytettävissä olevilla keinoilla, joten järkevintä on seurata kokonaisbakteeripitoisuutta ja säätää mikrobintorjuntakäsittelyä sen mukaan, käyttäen apuna myös itiömääritysten tuloksia. Kokonaisbakteeripitoisuudessa on mukana myös erittäin suuri määrä prosessin ajettavuuden ja lopputuotteen hygienian kannalta täysin harmittomia bakteereita. Toisaalta itiöpitoisuus määrittämisessä ei nähdä kaikkien itiöitymään pystyvien bakteereiden määrää. Täten sen enempää kokonaisbakteeripitoisuus kuin itiöpitoisuuskaan ei kerro koko totuutta edes hetkellisesti, mutta kun molempien määritysten tuloksia tarkastellaan yhdessä, saadaan ainakin kohtalainen kuva prosessin tilasta.

Jotta mikrobit saadaan pidettyä kurissa, on varmistettava etteivät prosessiin sisään tulevat raaka-aineet tuo liian suuria uusia mikrobikontaminaatioita mukanaan ja lisäksi siitä etteivät prosessissa esiintyvät mikrobit pääse kasvamaan rajoittamattomasti pitkä viiveisisissä säiliöissä. Kiertovesisysteemin mikrobintorjuntakäsittely on keskeinen kun halutaan varmistua, etteivät kontaminaatiot pääse leviämään prosessissa liian tehokkaasti.

Prosessissa tehtävien systeemipesujen tehokkuus vaikuttaa paljon mikrobiologisen tilan kehittymiseen. Mitä paremmin systeemi saadaan pestyä, sitä pitempään menee siinä että bakteeripitoisuudet kohoavat niin korkeiksi, että ne heikentävät koneen ajettavuutta tai tuotepuhtautta. Tämä johtuu prosessissa eri pinnoilla esiintyvien limasaostumien sisältämästä runsaasta mikrobimäärästä. Limasaostumissa esiintyvät mikrobit (sekä vegetatiiviset että itiöt) voivat kontaminoida prosessin hyvinkin nopeasti, mikäli saostumia ei poisteta pesujen yhteydessä riittävän tehokkaasti.

Tässä prosessissa tutkittuna ajankohtana esiintyneitä bakteereita voidaan testien perusteella torjua varsin tehokkaasti glutaraldehydiä sisältävillä mikrobintorjunta-aineilla ja liman muodostumista voidaan vähentää syöttämällä prosessiin biofilmi-inhibiittoria. Biofilmi-inhibiittorin annostelumääräksi riittänee 25 ml/min, tai annostelua voidaan myös laskea. Voisi olla hyödyllistä testata myös eri mikrobisidien vaikutusta biofilmin muodostukseen ja seurata vaikutuksia Robbins-systeemillä. Mikroskopian työläyden vuoksi olisi kuitenkin mielekästä automatisoida koepalojen analysointi ja ottaa käyttöön esimerkiksi kvantitatiivinen fluorometrinen skanneri tai ainakin tehokas kuva-analysaattoriohjelma.

Mikrobintorjuntaohjelmaa muokattaessa ja ylläpidettäessä tulee ottaa huomioon, että mikrobipopulaatiossa vallitsevat kannat vaihtuvat kuitenkin aika ajoin, joten mikrobien herkkyyttä eri mikrobintorjunta-aineille on syytä tarkkailla. Jotta käsittelysysteemi saadaan mahdollisimman tasapainoiseksi ja tehokkaaksi, kannattaa yhdellä koneella käyttää eri prosessin osissa yhteensä vähintään kahta ja mieluummin ainakin kolmea eri tehoainetta. Tässä työssä käsiteltyjen tekijöiden lisäksi tulee prosessissa käytettäviä mikrobintorjunta-aineita valittaessa ottaa erittäin huolellisesti huomioon kaikki muutkin torjunta-aineen toimintaan vaikuttavat tekijät, kuten käsiteltävän prosessivirran lämpötilan ja pH:n vaikutus limantorjunta-aineen stabiliteettiin sekä mahdollisten muiden kemikaalien vaikutus torjunta-aineeseen, esimerkiksi pelkistävät aineet kuten bisulfiitti neutraloivat monia tehoaineita. Aineita ja annostelustrategiaa muokattaessa on pidettävä mielessä, että vaikka jokin näyttäisi täydelliseltä paperilla laboratoriokokeiden perusteella, niin lopullinen toimivuus tai toimimattomuus näkyy aina vasta prosessissa muutamien viikkojen tai kuukausien koeajon jälkeen.

Kirjallisuusluettelo

- Anonyymi, *Packmittel, Butterreinwickler. Technische Lieferbedingungen, DIN standard 10 082*, Deutsches Institut für Normung, Saksa, 1989, 5 s.
- Anonyymi, *Puusta paperiin M-502, Paperikoneet yleistä*, METLAS KY, Karhula, 1990a, 238 s.
- Anonyymi, *Bacteriological examination of paper and paperboard. TAPPI standard T449 OM-90*, Technical Association of Pulp and Paper, USA, 1990b, 5 s.
- Anonyymi, *Fabrication of Single Service Containers and Closures for Milk and Milk Products- Guide for Sanitation Standards*, U.S. Dept. of Health, Education, Welfare & Public Health Service, Food and Drug Administration, USA, 1991.
- Anonyymi, *Puusta paperiin M-506, Kartonkikoneet*, METLAS KY, Lappeenranta, 1993, 262 s.
- Anonyymi, Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List 52, *Int. J. Syst.Bacteriol*, **45** (1995) 197-198.
- Anonyymi, Biofilm With Labels, <http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/ImageLibrary/Structure-Function/Full-image%20pages/BiofilmWithLabelsjpg.htm>, information haettu 25.08.2002, kuva on piirretty 1996.
- Anonyymi., *Biocides, basic chemistry*, Sisäinen koulutusmateriaali, Hercules Inc., 1999.
- Bendt, H. T., How to control bacteria growth in food-grade paperboard production, *Pulp Pap.*, **59** (1985) No 11, ss. 119-121.
- Brown, M. ja Gilbert, P., Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents, *J. Appl.Bacteriol. Sympos. Suppl.*, **74** (1993) 87S-97S.
- Bryers, J. D., Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2** (1994) 9-23.
- Bryers, J. D. ja Weightman, A., The centre for biofilm engineering: An international resource in managing complex biological systems, *SIM News*, **45** (1995) 103-111.
- Bunnage, W., Singleton, F. ja Cross, K., Inhibitor treatment program offers option for clearing biofilm buildup, *Pulp Pap.*, **74** (2000) June issue
- Characlis, W. G., Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotechnol Bioeng.*, **23** (1981) 1923-1960.
- Christensen, B. E., The role of extracellular polysaccharides in biofilms, *J. Biotechnol.*, **10** (1989) 181-202.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D. ja Lappin-Scott, H., Microbial biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.*, **49** (1995) 711-745.
- Davies, D. G., Parsek, M.R., Pearson, J. P., Inglewski, B. H., Costerton, J. W. ja Greenberg E. P., The involvement of cell-to-cell signalling in the development of a bacterial biofilm, *Science*, **280** (1998) 295-298.

- Davis, C. K. ja Smith, K. S., Controlling odor from volatile fatty acids in closed, recycled paper mill systems, *Pulp Pap.*, **75** (2001) No 12, December.
- Edwards, J. C., Biocides – bug killers that enhance pulpmaking and papermaking processes, *Tappi J.*, **79** (1996) 71-77.
- Exner, M., Tuschewitzki, G.J. ja Scharnagel, J., Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanical cleaning, *Zentralblatt Bakteriologie Hyg. B*, **183** (1987) 549-563.
- Freese, E. ja Heinze J., Metabolic and genetic control of bacterial sporulation. Teoksessa *The Bacterial Spore, Volume 2*, toim. Hurst, A. ja Gould G. W., St Edmundsbury Press, Iso Britannia, 1983, ss.102-172.
- Gaylarde, C., Microbial corrosion of metals, *Environ. Engng*, **4** (1989) No. 2, ss. 30-32.
- Gould, I., Non-biocidal methods of biofilm control, *Pap Technol.* **42** (2001) No 1, February.
- Gudlauskis, D.G., Whitewater system closure means managing microbiological buildup, *Pulp Pap.*, **70** (1996) No 3, 161-165.
- Hagen, C. ja Whitekettle, K., Cost-effective control methods deliver consistent water quality, *Pulp Pap.*, **72** (1998) No 7, ss.75-82.
- Harju-Jeanty, P. ja Väättänen, P., Detrimental micro-organisms in paper and cardboard mills, *Pap. Puu*, **57** (1984) 245-259.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. ja Williams, S., *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. painos., Williams & Wilkins, USA, 1994, 787 s.
- Husmark, U. ja Rönnner, U., Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions, *J. Appl. Microbiol.*, **69** (1990) 557-562.
- Husmark, U., *Adhesion mechanisms of bacterial spores to solid surfaces*, Väitöskirja, Chalmers University of Technology, Göteborg, Ruotsi, 1993, 35 s.
- Jalava, T. ja Skurnik, M., Pikadiagnostisten menetelmien soveltaminen elintarviketeollisuuden mikrobiologiseen laadunvalvontaan, *TEKES julkaisu 42/94*, 1994, 41 s.
- Johansen, C., Falholt, P. ja Gram, L., Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** (1997) 3724-3728.
- Jokinen, K., Mikrobiongelmat paperitehtailla, *Pap. Puu*, **60** (1987) 810-811.
- Jung, W. K., Mikro-organismen im Fabrikationswasser von Papierfabriken, *Papier*, **32** (1978) 550-554.
- Kiviranta A., Paperboard grades. Teoksessa *Paper and Board Grades*, toim. Paulapuro H., Fapet Oy, Suomi, 2000, ss.55-72.
- Kolari, M., Epifluoresenssimikroskopia, Konfokaalimikroskopia (CLSM, confocal laser scanning microscopy), *Paperiteollisuuden mikrobiologian 2000-seminaari*, Finn-fiber Oy, Lahti, 1998, 5 s.

- Kolari, M., Nuutinen, J. ja Salkinoja-Salonen, M., Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27** (2001) 343-351.
- Korhonen, J. ja Tuhkanen, T., Ozone as biocide in paper machine recycled white water, *Tappi J.*, **83** (2000) 75.
- Klahre, J., Lustenberger, M., Wingender, J. ja Flemming, H.-C., Mikrobielle Probleme in der Papierfabrikation, Teil 2. Nachweis und Analytik, *Papier*, **51** (1997) 228-238.
- Le Magrex, E., Brisset, L., Jacquelin, L.F., Carquin, J., Bonnaveiro, N. ja Choisy, C., Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria in biofilms, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2** (1994) 89-95.
- Lindqvist, P., Märkäosan mikrobiologiset torjuntamenetelmät, *Paperiteollisuuden mikrobiologian 2000-seminaari*, Finn-fiber Oy, Lahti, 1998, 7 s.
- Lindvall, O., Mikrobintorjunta ja paperiteollisuuden muuttuvat ympäristövaatimukset, *Pap. Puu*, **80** (1998) No 3, 151-153.
- Mattila, K., *Biofilms on stainless steels exposed to process waters*, Väitöskirja, *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis 15/2002*, Helsinki, 2002, 71s.
- Mattila, K., Weber, A. ja Salkinoja-Salonen M. S., Structure and on-site formation of biofilms in paper machine water flow, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **28** (2002) 268-279.
- Mattila-Sandholm, T. ja Wirtanen, G., Biofilmi – mikrobien suojautumiskeino puhdistusta vastaan, *Kemia-Kemi*, **19** (1992) 226-230.
- Mentu, J., Uudet mahdollisuudet mikrobitorjunnassa, *Insko-seminaari, Märkäosan kemian hallinta paperinvalmistuksessa, Luentokansio P906203/97*, AEL/METSKO, Porvoo, 1997.
- Mentu, J., Pirttijärvi, T., Lindell, H. ja Salkinoja-Salonen, M., Microbiological control of pigments and fillers in paper industry, teoksessa *The fundamentals of papermaking materials, Transactions of the 11th fundamental research symposium held at Cambridge: September 1997, Volume 2*, toim. Baker C., Pira International, 1997, ss. 955-992.
- Mentu, J., Paperiteollisuuden mikrobiongelmat, *Paperiteollisuuden mikrobiologian 2000-seminaari*, Finn-fiber Oy, Lahti, 1998, 19 s.
- Mentu, J., *Suullinen tiedonanto*, Stora-Enso Oyj., 1999.
- Morton, L., ja Burman, S., Biofilms in biodeterioration – A review, *Int. Biodet. Biodegrad.*, **32** (1994), 203-221.
- Nakamura, L. K., Reclassification of “*Bacillus pulvifaciens*” group II as *Brevibacillus agri*, *Curr. Microbiol.*, **34** (1997) 233-237.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. ja Schaechter, M., *Physiology of the Bacterial Cell, a Molecular Approach*, Sinauer Associates Inc., USA, 1990, 506 s.
- Oppong, D., King, V. A., Zhou, X. ja Bowen, J. A., Cultural and biochemical diversity of pink-pigmented bacteria isolated from paper mill slimes, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25** (2000) 74-80.

- Paulus, W., *Microbisides for the protection of materials, A Handbook*, Chapman & Hall, Iso Britannia, 1993, 496 s.
- Pieniniemi, K., Paperinvalmistuksen kiertovesien bakteerien kvantifiointi, *Pap. Puu*, **77** (1995) 562-564.
- Pietiläinen, A., BFM biofilm monitor, *Paperiteollisuuden mikrobiologian 2000-seminaari*, Finn-fiber Oy, Lahti, 1998, 3 s.
- Pirttijärvi, T. S. M., Graeffe, T. H. ja Salkinoja-Salonen, M. S., Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment for potential for food spoilage, *J. Appl. Bacteriol.*, **81** (1996) 445-458.
- Priest, F. G., Bacillus, teoksessa *Biotechnology: a multivolume comprehensive treatise, Vol. 1, Biological Fundamentals*, Toim. Sahm H., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Federal Republic of Germany, 1993, ss. 367-400.
- Robertson, L. ja Taylor, N., Biofilms and dispersants: A less-toxic approach to deposit control, *Tappi J.*, **77**(1994) 99-103.
- Ross, R. T. ja Hollis, G. C, Microbiological deterioration of pulpwood, paper and paint, teoksessa *Industrial Microbiology*, toim. Miller B. M. ja Litsky W., McGraw-Hill Book Company, USA, 1976, ss. 309-341.
- Rönner, U., Husmark, U. ja Henrikson, A., Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity, *J. Appl. Bacteriol.*, **69** (1990) 550-556.
- Salkinoja-Salonen, M., Microbial contaminations of paper machines, *Comett-course, Biotechnology for the pulp and paper industries, Module II*, Espoo, 1994, 5 s.
- Schenker, A., Biodispergering, morgondagens mikrobiologiska tillväxtkontroll?, *Svensk Papperstidn.*, **99** (1996) No. 1, 24-25.
- Schenker, A., Singleton, F. ja Davis, C., Non biocidal programmes for biofilm Control in papermachine circuits, *EUCEPA Symposium 1998, Chemistry in Papermaking, Proceedings*. ATICELCA-EUCEPA, Italia, 1998, ss. 331-354.
- Shida, O., Tagaki, H., Kadowaki, K. ja Komagata, K., Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46** (1996) 939-946.
- Shida, O., Tagaki, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. ja Komagata, K., Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47** (1997) 289-298.
- Siika-aho, M., Rättö, M., Piskonen, R., Salo, S., Buchert, J. ja Viikari, L., Enzymatic control of paper machine slimes, *Investigación y técnica del papel* **146** (2000) 667-675.
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. ja Painter, P., *General Microbiology*, 5. ed., Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 1987, 689 s.
- Sundholm, P., Mill operations in production in production of main paper and board grades, teoksessa *Papermaking Part 1, Stock Preparation and Wet End*, Toim. Paulapuro, H. Fapet Oy, 2000, ss. 10-55.

- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, J. B., Andersen, J. B., Jacobsen C. S. ja Molin S., Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms, *J. Bacteriol.* **182** (2000) 6482-6489.
- Tunlid, A. ja White, D. C., Biochemical analysis of biomass, community structure , nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil, Teoksessa *Soil biochemistry*, Vol 7, Toim., Stotzky, G. ja Bollag, J.-M., Marcel Dekker Inc., USA, 1992, ss. 229-262.
- Uutela, P., Mattila, K., Carpén, L., Raaska, L., Hakkarainen, T. ja Salkinoja-Salonen, M., Biogenic thiosulfate and oxalate in paper machine deposits connected to corrosion of stainless steels, *Int. . Biodet. Biodegrad.*, Article in press - Accepted 1 February 2002.
- Valtonen, T., *Suullinen tiedonanto*, BetzDearborn Oy, 1999.
- Weise, U., Terho, J. ja Paulapuro, H., Stock and water systems of the paper machine. Teoksessa *Papermaking Part1, Stock Preparation and Wet End*, toim.Paulapuro H., Fapet Oy, Suomi, 2000, ss. 123-190.
- Väisänen, O., Elo, S., Marmo, S. ja Salkinoja-Salonen, M., Enzymatic characterization of Bacilli from food packaging paper and board machines, *J. Industr. Microbiol.*, **4** (1989) 419-428.
- Väisänen, O. ja Salkinoja-Salonen, M., Use of phage typing and fattyacid analysis for the identification of Bacilli isolated from food packaging paper and board machines, *System. Appl. Microbiol.*, **12** (1989) 103-111.
- Väisänen, O., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Marmo, S. ja Salkinoja-Salonen, M., Structure and composition of biological slimes on paper and board machines, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** (1994), 641-653.
- Väisänen, O., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F., Busse, H.-J. ja Salkinoja-Salonen, M., Microbial communities of printing paper machines, *J. Appl. Microbiol.*, **84** (1998), 1069-1984.
- Wainess, H., Hygiene, *Bull. Int. Dairy Fed.*, **143** (1982) 31-36.
- Werner, H. G. ja Casini, G., Hercules introduces the latest concept in microbiological control – the ammonium bromide technology, *Przeglad Papierniczy*, **58** (2002) No. 5 May.
- Wirtanen, G., *Biofilm formation and its elimination from food processing equipment*, Väitöskirja, VTT publications 251, Espoo, 1995, 106 s.
- Wirtanen, G., Alanko, T., Mattila-Sandholm, T., Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **5** (1996) 319-326.
- Young, I. E ja FitzJames, P., Chemical and morphological studies of bacterial spore formation, I, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6** (1959) 467, ref., Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. ja Painter, P. R., *General Microbiology*, 5. ed., Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 1987, s. 477.

LIITE A: Prosessinäytteiden mikrobimääritysten tulokset ja tulosten korrelaatiokertoimet lopputuotteen normalisoidun kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa

Näytepiste	Tuote-normalisoitu KB 30 C	Koivumassa Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C	Mäntymassa Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C
Päiväys ja aika	KB 30 C	Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C	Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C
23.09.1998 08:00	0,7612	20	3	18000	-	9	<20	33000	-
24.09.1998 23:00		9	10	1300	40000	18	33	13000	345000
28.09.1998 21:00	0,5542	-	-	-	-	9	<20	21250	1387500
30.09.1998 21:00	0,5894	2	10	29100	1260000	2	<20	188000	45000
05.10.1998 05:30	1,0000	245	3	186000	2500000	135	<20	120500	545000
06.10.1998 06:00	0,7673	58	2118	205000	1002500	1835	10000	114000	908750
28.10.1998 08:00	0,9315	289	125	-	304,875	134	20	-	294204
03.11.1998 06:00		7	15	-	300	9	8	-	4550
04.11.1998 05:00	0,6386	0	10	-	200	33	143	-	1600
07.11.1998 11:00		45	123	-	170	30	48	-	1575
08.11.1998 09:30		23	70	-	425	25	55	-	2185
09.11.1998 18:40	0,6322	9	103	-	22	16	41	-	210
02.12.1998 05:30	0,8456	286	65	-	190	127	34	-	1035
Korrelaatio lopputuotteen									
KB 30°C kanssa	1,00	0,88	0,00	0,65	0,36	0,14	0,01	0,11	-0,09

Yksikkönä pmy/ml ellei muuta ole mainittu.

LIITE A: Prosessinäytteiden mikrobimäärittysten tulokset ja tulosten korrelaatiokertoimet lopputuotteen normalisoidun kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa

Näytepiste	Tuote-normalisoitu	CTMP	Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C	Hylky	Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C
Päiväys ja aika	KB 30 C		Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C	Hylky	Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C
23.09.1998 08:00	0,7612	139		205	133000			479	86	665000	
24.09.1998 23:00		18		50	27000	622500		236	153	360000	1317500
28.09.1998 21:00	0,5542	30		28	13675	937500		352	66	51500	6142500
30.09.1998 21:00	0,5894	266		98	718000	722000		77	1620	2341250	1532500
05.10.1998 05:30	1,0000	400		143	348000	1400000		3213	157	2850000	5500000
06.10.1998 06:00	0,7673	116000		10000	329000	1376000		310000	55000	3750000	8300000
28.10.1998 08:00	0,9315	625		23	-	446134		3000	119	-	8688169
03.11.1998 06:00		50		50	-	1200		170	154	-	242833
04.11.1998 05:00	0,6386	25		25	-	1400		292	38	-	19975
07.11.1998 11:00		98		289	-	1165		458	1061	-	13150
08.11.1998 09:30		193		500	-	8610		201	363	-	22450
09.11.1998 18:40	0,6322	32		225	-	490		78	103	-	5375
02.12.1998 05:30	0,8456	3752		1180	-	7000		-	355	-	10500
Korrelaatio lopputuotteen											
KB 30'C kanssa	1,00	0,06		0,08	0,00	0,26		0,09	0,04	0,50	0,41

Yksikkönä pmy/ml ellei muuta ole mainittu.

LIITE A: Prosessinäytteiden mikrobimäärittysten tulokset ja tulosten korrelaatiokertoimet lopputuotteen normalisoidun kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa

Näytepiste	Tuote-normalisoitu KB 30 C	Kiertovesi Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C	Kiekkosuodin		KB 30C	KB 50C
Päiväys ja aika						Itiöt 30C	Itiöt 50C		
23.09.1998 08:00	0,7612	48	8	180000	-	132	710	270000	-
24.09.1998 23:00		25	25	28000	935000	311	400	250000	3000000
28.09.1998 21:00	0,5542	34	10	3775	2100000	373	155	70000	11300000
30.09.1998 21:00	0,5894	48	85	772500	34000	334	304	4700000	281000
05.10.1998 05:30	1,0000	468	20	1000000	1100000	1625	250	5700000	17500000
06.10.1998 06:00	0,7673	143	85	1200000	16500000	1400	7350	7700000	>1E5
28.10.1998 08:00	0,9315	500	25	-	6900000	2000	215	-	2343493
03.11.1998 06:00		150	10	-	4500	50	175	-	6800
04.11.1998 05:00	0,6386	27	10	-	6450	-	88	-	115000
07.11.1998 11:00		161	200	-	710	480	1888	-	45000
08.11.1998 09:30		150	196	-	1230	455	500	-	34000
09.11.1998 18:40	0,6322	39	58	-	12100	160	125	-	420
02.12.1998 05:30	0,8456	595	150	-	6800	2381	468	-	5335
Korrelaatio lopputuotteen									
KB 30°C kanssa	1,00	0,85	0,06	0,54	0,23	0,77	0,07	0,45	0,37

Yksikkönä pmy/ml ellei muuta ole mainittu.

LIITE A: Prosessinäytteiden mikrobimääritysten tulokset ja tulosten korrelaatiokertoimet
lopputuotteen normalisoidun kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa

Näytepiste	Tuote-normalisoitu KB 30 C	Perälaattikko 1			Perälaattikko 2		
		Itiöt 30C	KB 30C	Itiöt 50C	Itiöt 30C	KB 30C	KB 50C
23.09.1998 08:00	0,7612	-	-	-	89	-	-
24.09.1998 23:00		-	-	-	73	-	-
28.09.1998 21:00	0,5542	-	-	-	41	15000	1640000
30.09.1998 21:00	0,5894	-	-	-	98	1472500	61000
05.10.1998 05:30	1,0000	-	-	-	493	1042500	4800000
06.10.1998 06:00	0,7673	439	320000	1425	3950	1445000	3000000
28.10.1998 08:00	0,9315	250	-	18	1039	-	341922
03.11.1998 06:00		14	-	10	273	-	4400
04.11.1998 05:00	0,6386	2	-	10	14	-	7700
07.11.1998 11:00		107	-	123	178	-	7600
08.11.1998 09:30		86	-	206	70	-	5400
09.11.1998 18:40	0,6322	52	-	38	34	-	641
02.12.1998 05:30	0,8456	171	-	66	860	-	4500
Korrelaatio lopputuotteen							
KB 30°C kanssa	1,00	0,57	-	0,03	0,29	0,23	0,49

LIITE A: Prosessinäytteiden mikrobimääritysten tulokset ja tulosten korrelaatiokertoimet lopputuotteen normalisoidun kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa

Näytepiste	Tuote-normalisoitu	Perälaattikko 3			Lämminvesti					
Päiväys ja aika	KB 30 C	Itiöt 30C	Itiöt 50C	KB 30C	KB 50C	Itiöt 30C/50ml	Itiöt 50C/50ml	KB 30C	KB 50C	
23.09.1998 08:00	0,7612	-	-	-	-	<20/1ml	<20	<50	-	
24.09.1998 23:00		-	-	-	-	<20/1ml	<20	<50	1180	
28.09.1998 21:00	0,5542	-	-	-	-	4	10	1	17	
30.09.1998 21:00	0,5894	-	-	-	-	13	12	80	980	
05.10.1998 05:30	1,0000	-	-	-	-	340	39	890	1000	
06.10.1998 06:00	0,7673	255	1300	448750	1500000	<5	<5	1420	11450	
28.10.1998 08:00	0,9315	100	9	-	12500	32	3	-	559	
03.11.1998 06:00		5	26	-	500	1	3	-	37	
04.11.1998 05:00	0,6386	117	146	-	2300	1	2	-	13	
07.11.1998 11:00		86	100	-	1390	-	1	-	23	
08.11.1998 09:30		55	130	-	1255	1	4	-	112	
09.11.1998 18:40	0,6322	16	63	-	55	3	3	-	135	
02.12.1998 05:30	0,8456	138	55	-	70	-	-	-	-	
Korrelaatio lopputuotteen										
KB 30°C kanssa	1,00	0,28	-0,05	-	0,02	0,76	0,57	0,69	0,15	

LIITE A: Prosessinäytteiden mikrobimääritysten tulokset ja tulosten korrelaatiokertoimet
lopputuotteen normalisoidun kokonaisbakteeripitoisuuden (30°C) kanssa

Näytepiste	Tuote-normalisoitu KB 30 C	Raakavesi Itiöt 30C/50ml	Itiöt 50C/50ml	KB 30C	KB 50C	Kemiallisesti puhd. raakavesi Itiöt 30C/50mlItiöt 50C/50ml		KB 30C	KB 50C
23.09.1998 08:00	0,7612	<20	<20	55	-	<20	<20	8	-
24.09.1998 23:00		<20	<20	150	<10	<20	<20	7	6
28.09.1998 21:00	0,5542	46	11	20	4	2	2	9	2
30.09.1998 21:00	0,5894	8	36	87	9	2	2	18	3
05.10.1998 05:30	1,0000	23	7	39	2	13	10	36	3
06.10.1998 06:00	0,7673	<5	<5	34	2	<5	<5	24	1
28.10.1998 08:00	0,9315	15	7	16	-	29	8	11	-
03.11.1998 06:00		24	11	14	-	30	8	11	-
04.11.1998 05:00	0,6386	25	12	28	-	80	12	20	-
07.11.1998 11:00		22	18	20	-	13	17	22	-
08.11.1998 09:30		14	17	31	-	22	15	24	-
09.11.1998 18:40	0,6322	30	27	17	-	20	22	20	-
02.12.1998 05:30	0,8456	-	-	-	-	-	-	-	-
Korrelaatio lopputuotteen									
KB 30°C kanssa	1,00	-0,35	-0,60	-0,17	-0,70	0,01	0,10	0,45	0,11

Yksikkönä pmy/ml ellei muuta ole mainittu.

Liite B. Kiertovesinäytteiden sekä massa- ja perälaatikkonäytteiden**kokonaisbakteeripitoisuuksien ja itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiokertoimet**

		Kiertovesi, itiöt 30°C	Kiertovesi, itiöt 50°C	Kiertovesi, KB 30°C	Kiertovesi, KB 50°C
Koivumassa	Itiöt 30C	0,98	0,07	0,13	0,16
	Itiöt 50C	-0,06	0,10	0,62	0,93
	KB 30C	0,19	-0,14	0,92	0,65
	KB 50C	0,21	-0,22	0,87	0,20
Mäntymassa	Itiöt 30C	0,04	0,08	0,67	0,93
	Itiöt 50C	-0,11	0,00	1,00	0,92
	KB 30C	-0,04	-0,08	0,89	0,29
	KB 50C	-0,10	-0,38	0,36	0,53
CTMP	Itiöt 30C	-0,04	0,08	0,65	0,91
	Itiöt 50C	0,00	0,15	0,64	0,89
	KB 30C	-0,07	-0,05	0,82	0,21
	KB 50C	0,07	-0,36	0,82	0,58
Hylky	Itiöt 30C	0,00	0,11	0,66	0,92
	Itiöt 50C	-0,07	0,09	0,67	0,91
	KB 30C	0,57	0,73	1,00	0,60
	KB 50C	0,29	-0,38	0,50	0,77
Kiertovesi	Itiöt 30C	1,00	0,19	0,10	0,09
	Itiöt 50C	0,19	1,00	-0,07	-0,09
	KB 30C	0,10	-0,07	1,00	0,57
	KB 50C	0,09	-0,09	0,57	1,00
Kiekkosuodin	Itiöt 30C	0,92	0,20	0,29	0,40
	Itiöt 50C	-0,06	0,22	0,61	0,87
	KB 30C	0,09	-0,04	0,99	0,61
	KB 50C	0,23	-0,42	0,58	0,22
Perälaatikko 1	Itiöt 30C	0,37	0,31	0,36	0,88
	Itiöt 50C	-0,16	0,09	0,99	0,89
	KB 30C	-0,06	0,07	0,66	0,91
	KB 50C	-0,15	-0,03	1,00	0,92
Perälaatikko 2	Itiöt 30C	0,23	0,08	0,63	0,95
	Itiöt 50C	-0,08	0,05	0,65	0,91
	KB 30C	0,00	-0,03	0,96	0,49
	KB 50C	0,11	-0,37	0,62	0,37
Perälaatikko 3	Itiöt 30C	0,29	0,34	0,29	0,73
	Itiöt 50C	-0,21	0,01	0,99	0,88
	KB 30C	-0,06	0,07	0,66	0,91
	KB 50C	-0,15	-0,04	1,00	0,92

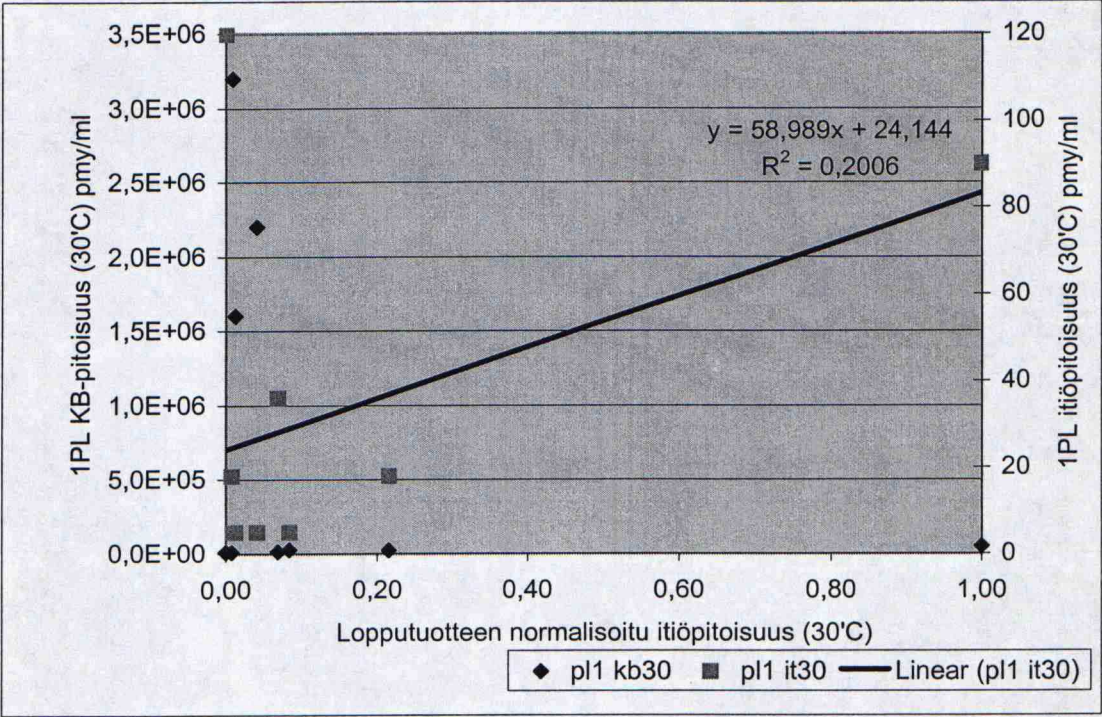
Liite C. Kiekkosuotimen kakun sekä massa- ja perälaatikkonäytteen

kokonaisbakteeripitoisuuksien ja itiöpitoisuuksien väliset korrelaatiokertoimet

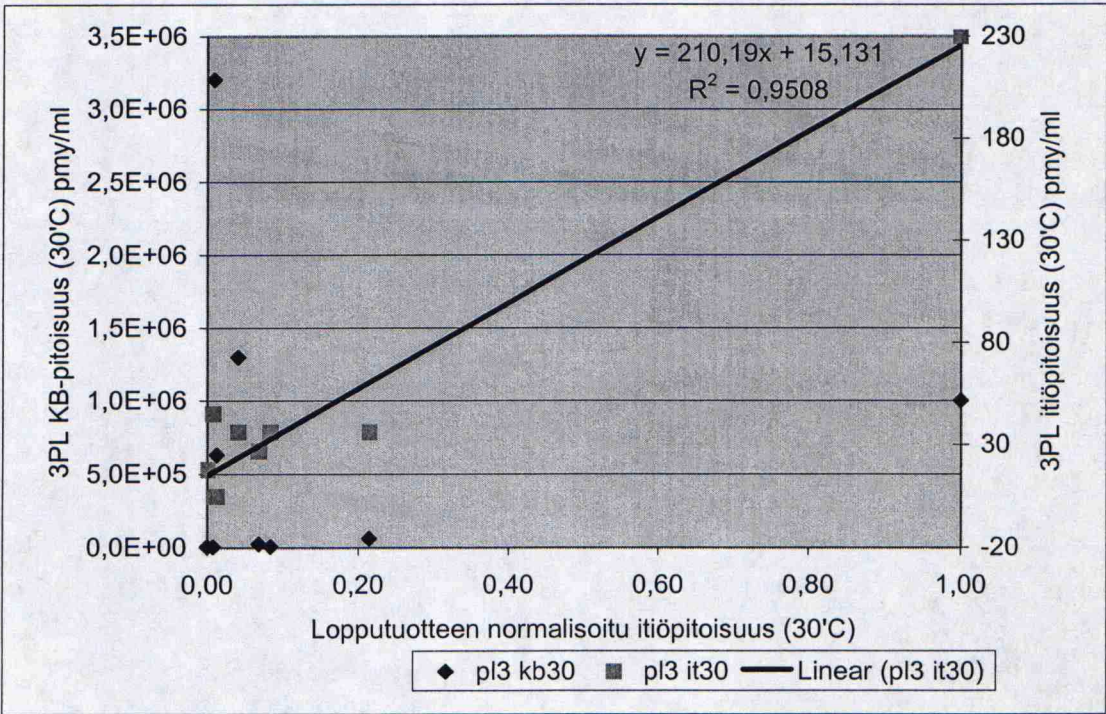
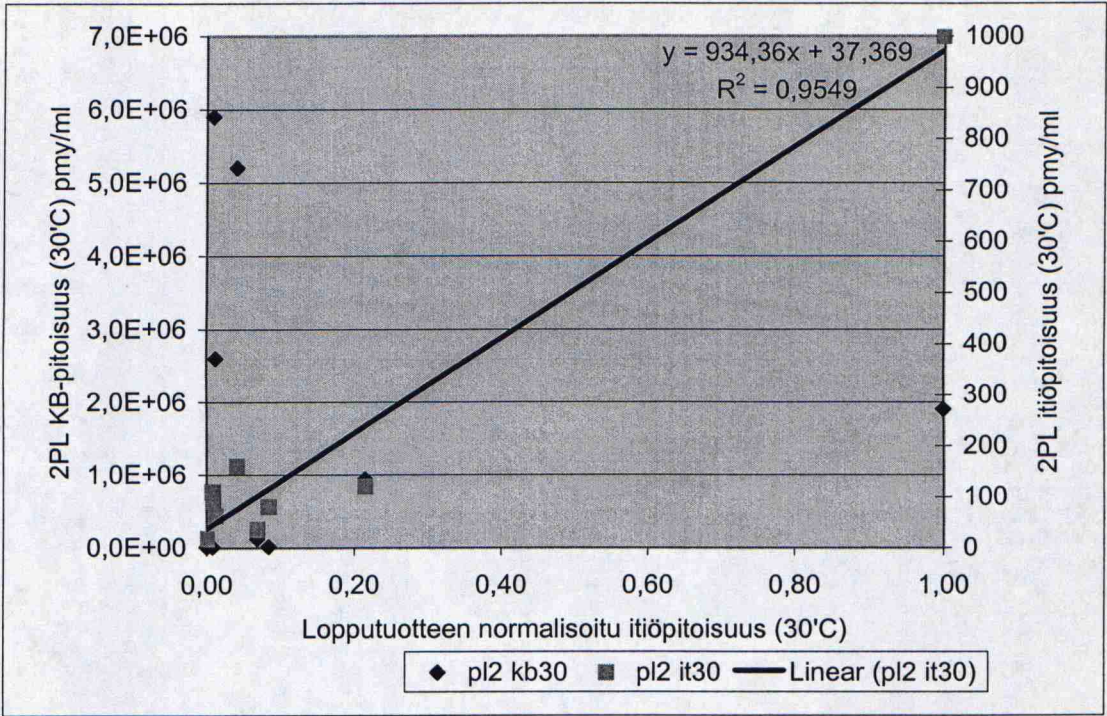
		Kiekkosuoti- men kakku, itiöt 30°C	Kiekkosuoti- men kakku, itiöt 50°C	Kiekkosuoti- men kakku, KB 30°C	Kiekkosuoti- men kakku, KB 50°C
Koivumassa	Itiöt 30C	0,94	-0,06	0,51	0,29
	Itiöt 50C	0,26	0,98	0,66	-0,35
	KB 30C	0,97	0,64	0,87	0,96
	KB 50C	0,27	0,19	0,61	0,86
Mäntymassa	Itiöt 30C	0,33	0,96	0,70	0,36
	Itiöt 50C	0,25	0,97	1,00	-0,28
	KB 30C	0,42	0,21	0,80	-0,16
	KB 50C	0,14	0,37	-0,20	0,76
CTMP	Itiöt 30C	0,27	0,97	0,67	-0,13
	Itiöt 50C	0,30	0,97	0,68	-0,26
	KB 30C	0,24	0,11	0,69	-0,30
	KB 50C	0,30	0,46	0,72	0,88
Hylky	Itiöt 30C	0,38	0,97	0,68	0,60
	Itiöt 50C	0,24	0,97	0,68	-0,27
	KB 30C	0,80	0,66	0,99	0,22
	KB 50C	0,50	0,44	0,47	0,64
Kiertovesi	Itiöt 30C	0,92	-0,06	0,57	0,23
	Itiöt 50C	0,20	0,22	0,74	-0,42
	KB 30C	0,82	0,61	0,99	0,28
	KB 50C	0,40	0,87	0,61	0,22
Kiekkosuodin	Itiöt 30C	1,00	0,23	0,82	0,26
	Itiöt 50C	0,23	1,00	0,65	-0,21
	KB 30C	0,82	0,65	1,00	0,24
	KB 50C	0,26	-0,21	0,24	1,00
Perälaatikko 1	Itiöt 30C	0,68	0,82	-	0,75
	Itiöt 50C	0,22	0,98	-	-0,30
	KB 30C	-	-	-	-
	KB 50C	0,23	0,98	-	0,21
Perälaatikko 2	Itiöt 30C	0,51	0,92	0,73	0,09
	Itiöt 50C	0,23	0,97	0,66	-0,31
	KB 30C	0,59	0,51	0,94	-0,11
	KB 50C	0,25	0,31	0,19	0,84
Perälaatikko 3	Itiöt 30C	0,55	0,81	-	0,25
	Itiöt 50C	0,18	0,97	-	-0,54
	KB 30C	-	-	-	-
	KB 50C	0,23	0,97	-	0,99

Liite D. Perälaatikoiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet
ja lopputuotteen normalisoidut mikrobipitoisuudet osittain erillisillä näytekerroksilla

pvm	tuote kb30	tuote it30	pl1 kb30	pl1 it30	pl2 kb30	pl2 it30	pl3 kb30	pl3 it30
01.09.98	0,02	0,00	9,5E+03	120	7,3E+03	18	4,2E+03	18
02.09.98	0,08	0,08	2,5E+04	5	1,1E+04	81	6,1E+03	36
03.09.98	0,00	0,01	9,5E+03	18	8,9E+03	110	3,7E+03	45
28.10.98	1,00	1,00	4,8E+04	90	1,9E+06	1000	1,0E+06	230
29.10.98	0,42	0,22	2,2E+04	18	9,4E+05	120	6,0E+04	36
30.10.98	0,10	0,07	1,3E+04	36	1,2E+05	36	2,3E+04	27
28.09.98	0,00	0,01	1,6E+06	5	2,6E+06	63	6,3E+05	5
29.09.98	0,06	0,04	2,2E+06	5	5,2E+06	160	1,3E+06	36
30.09.98	0,01	0,01	3,2E+06	5	5,9E+06	90	3,2E+06	5
correl kb	1,00	0,98	-0,34	0,42	-0,07	0,93	-0,01	0,93
correl it	0,98	1,00	-0,30	0,45	-0,04	0,98	0,04	0,98



Liite D. Perälaatikoiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet
ja lopputuotteen normalisoidut mikrobipitoisuudet osittain erillisillä näyttekierroksilla



Liite E. Keskeisimpien lisäaineiden sekä päällystyspaspojen ja taustan kostutus veden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuusmäärittysten tulokset

Näytepiste	Pastan ajosäiliö 2				Pastan ajosäiliö 4				Taustavesi			
	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C
Pvm												
23.09.98	-	-	-	-	<20	<20	370	-	<20	<20	<100	-
24.09.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28.09.98	<20	<20	150	<100	<20	<20	670	<100	-	-	-	-
30.09.98	-	-	-	-	<20	<20	<100	3180	53	93	<10	>1000
05.10.98	-	-	-	-	<20	<20	1130	<100	38	<20	>1000	<10
06.10.98	-	-	-	-	<20	<20	1660	<10	48	180	92	<100
28.10.98	-	-	-	-	-	<20	-	-	-	-	-	-
03.11.98	<20	<20	-	30	<20	<20	-	<100	<20 (18)	<20 (14)	-	<10
04.11.98	<20	<20	-	<100	<20 (15)	<20	-	<10	<20	36	-	<10
07.11.98	<20	<20	-	<100	25	<20	-	<100	66	<20	-	<10 (4)
08.11.98	<20	<20	-	<100	<20	<20	-	<100	20	59	-	<10
09.11.98	<20	<20	-	<100	<20	<20	-	<100	<20	<20	-	<10
02.12.98	<20	<20	-	-	-	<20	-	-	-	-	-	-

Näytepiste	Pintaliima				Spraytärkki				Neutraaliiliima				Massatärkki			
	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C	Ittiöt 30°C	Ittiöt 50°C	KB 30°C	KB 50°C
Pvm																
23.09.98	<20	<20	<100	-	<20 (2)	<20	2400	-	<20	<20	<100	-	<20	<20	<100	-
24.09.98	<20	<20	<100	<100	-	-	-	-	<20	<20	<100	<100	<20	<20	<100	<100
28.09.98	<20	<20	<10	<10	-	-	-	-	<20	<20	10	<10	<20	<20	<10	<10
30.09.98	<20	<20	<10	<10	-	-	-	-	<20	<20	<10	<10	<20	<20	<10	<10
05.10.98	<20	<20	<10	<10	-	-	-	-	<20	<20	<10	<10	<20	<20	17	<10
06.10.98	<20	<20	<10	<10	-	-	-	-	<20	<20	<10	<10	<20	<20	<10	<10
28.10.98	-	-	-	-	<20	<20	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-
03.11.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04.11.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07.11.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08.11.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09.11.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02.12.98	1048	<20	-	<10	<20 (18)	<20	-	<10	-	-	-	<10	<20	<20	-	<10

Liite F: Identifiointia varten otettujen näytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet ja eristettyjen kantojen esiintyminen eri näytteissä

Taulukko F-1. Identifiointiin otettujen näytteiden kokonaisbakteeri- ja itiöpitoisuudet

Näytteenottopaikka	Kokonaisbakteeripitoisuus pmy/ml	Itiöpitoisuus pmy/ml
Pintaliima	<2000	<1000
Pastan ajosäiliö 4	<2000	<1000
Taustankostutusvesi	500 000	10 000
Neutraaliliima	<2000	<1000
Massatärkki	<2000	<10
Mäntymassa	160 000	<1000
CTMP	540 000	<1000
Hylky	1 100 000	<1000
Kiertovesitorni	1 000 000	<1000
Perälaatikko 2	970 000	60
Kiekkosuotimenkakku	10 000 000	<10
Lämminvesi	4000	<10
Raakavesi	18 000	<10
Kem. puhd. vesi	<2000	<10
Koivumassa	750 000	2000
Hylky 2	900 000	4000

Taulukko F-2. Eristettyjen kantojen esiintyminen eri näytteissä. M: vallitseva kanta, S: sekundäärinen kanta, i: kyseinen kanta on valittu itiömaljalta

Näyte / kanta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Lopputuote	M				Mi										Mi	Mi
Lopputuote	M				Si										Mi	Mi
Lämminvesi									M							
Raakavesi										M						
Perälaatikko2		M							M							
Taustankost.vesi	M										Mi					
Mänty	M											M				
CTMP	S	M	M	S				S				S				
Koivu			M			M		M					M	M		
Hylky 2							M			M		M				

LIITE G: Eristettyjen kantojen morfologiset ominaisuudet ja mahdollinen identifointitulos

Group	Colony morphology			Surface		Microscopic features		Growth after heat treatment	Identification of representative isolate
	Colour	Form	Margin	Opacity	Surface	Cell morphology	Gram stain		
1	dark yellow	circular	entire	translucent	smooth	single rods	-	no	<i>Sphingomonas capsulata</i> (ID3466) <i>Clavibacter michiganense</i> (ID3468)
2	light yellow	circular	entire	transparent	smooth	single rods	-	no	
3	white	circular	entire	translucent	mucoïd	single rods	-	no	
4	orange	circular	entire	opaque	mucoïd	single, short rods	-	no	
5	white	irregular	filamentous	opaque	rough	rods, single & chains	+	no	Organism belonging to <i>Bacillus cereus</i> group (ID3473)
6	light yellow	circular	entire	translucent	mucoïd	single rods	-	no	Organism belonging to <i>Flavobacterium-Cytophaga</i> group (ID3469)
7	brown	circular	entire	transparent	smooth	single rods	-	no	
8	beige	circular	entire	transparent	mucoïd	single rods	+	no	
9	pink-brown	circular	entire	opaque	smooth	single rods	-	no	
10	light brown	circular	entire	transparent	smooth	single rods	-	no	Probably <i>Paenibacillus</i> species (ID3467)
11	crème	circular	entire	translucent	smooth	single rods	+	yes	
12	light pink	circular	entire	translucent	smooth	single rods	-	no	Probably <i>Paenibacillus</i> species (ID3472)
13	yellow-orange	circular	entire	opaque	mucoïd	single rods	-	no	
14	orange	circular	entire	opaque	smooth	rods, chains	-	no	
15	white	irregular	curled	transparent	smooth	variable	+	yes	
16	beige	irregular	curled	opaque	smooth	single rods	+	no	Organism belonging to Genus <i>Bacillus</i> or related taxa (ID3471)

Liite H. Tehoainetestauksen tulokset

Taulukko H-1. Tehoainetestauksessa määritetyt kokonaisbakteeripitoisuudet

Biosidi	0 h	1 h	3 h	1 vrk
Referenssi	$1.6 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$	$2.1 \cdot 10^6$	$4.0 \cdot 10^6$
D 856		$1.9 \cdot 10^6$	$2.9 \cdot 10^5$	$4.9 \cdot 10^6$
D 7815 /25%		$2.7 \cdot 10^4$	$2.4 \cdot 10^4$	$6.1 \cdot 10^3$
D 7815 /50%		$2.2 \cdot 10^4$	$1.8 \cdot 10^4$	$5.0 \cdot 10^2$
D 7848		$1.2 \cdot 10^5$	$8.0 \cdot 10^4$	$1.4 \cdot 10^4$
D 7849		$3.4 \cdot 10^5$	$2.4 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^4$
RX-136		$2.9 \cdot 10^5$	$1.6 \cdot 10^5$	$6.5 \cdot 10^3$
H ₂ O ₂		$1.3 \cdot 10^5$	$7.6 \cdot 10^4$	$8.7 \cdot 10^6$

Taulukko H-2. Tehoainetestauksessa määritetyt itiöpitoisuudet

Biosidi	0 h	1 h	3 h	1 vrk
Referenssi	$1.6 \cdot 10^3$	$1.6 \cdot 10^3$	$1.8 \cdot 10^3$	$4.9 \cdot 10^3$
D 856		$1.2 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^4$	$6.9 \cdot 10^3$
D 7815 /25%		$1.6 \cdot 10^4$	$1.6 \cdot 10^3$	$3.5 \cdot 10^3$
D 7815 /50%		$2.0 \cdot 10^2$	$2.0 \cdot 10^2$	$2.0 \cdot 10^2$
D 7848		$3.5 \cdot 10^3$	$1.1 \cdot 10^4$	$6.1 \cdot 10^3$
D 7849		$1.1 \cdot 10^4$	$1.3 \cdot 10^4$	$5.1 \cdot 10^3$
RX-136		$1.6 \cdot 10^4$	$2.4 \cdot 10^3$	$3.5 \cdot 10^3$
H ₂ O ₂		$1.0 \cdot 10^4$	$7.7 \cdot 10^3$	$6.1 \cdot 10^3$

